GRIGORE MIHAESCU

IMUNOLOGIE
si
IMUNOCHIMIE

EDITURA UNIVERSITATII DIN BUCURESTI
2001

Referenti stiintifici: Prof. dr. Tatiana Vassu
Prof. dr. Toma Nicolae

© Editura Universitatii din Bucuresti
Sos. Panduri, 90–92, Bucuresti – 76235; Telefon/Fax: 410.23.84
E–mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizata: Victoria Iacob

Descrierea CIP a Bibliotecii Nationale
MIHAESCU GRIGORE
Imunologie si imunochimie / Grigore Mihaescu, Bucuresti: Editura Universitatii din Bucuresti, 2001
456 p.
Bibliogr.
ISBN 973-575-556-4

57.08

CUPRINS

Cuvânt înainte 3
Introducere 5
Etapele dezvoltarii Imunologiei ca stiinta 7
Diviziunile Imunologiei 11

Capitolul 1. **Caracterizarea generala a antigenelor** 13
Modelul general de structura a unui antigen 14
Proprietatile definitorii ale antigenelor 15
Clasificarea si imunogenitatea antigenelor 16
Antigene naturale 16
Antigene moleculare 16
Haptene 22
Antigene corpusculare 23
Antigene artificiale 25
Antigene sintetice 29
Determinantii antigenici 30
Efectul de carrier 32
Factorii care conditioneaza imunogenitatea 33
Antigene endogene 37
Antigene heterofile 38
Adjuvantii 40

Capitolul 2. **Imunoglobulinele (Anticorpii)** 43
Structura moleculei de imunoglobulina 44
Functiile moleculei de imunoglobulina 49
Heterogenitatea anticorpilor 51
Heterogenitatea izotipica 51
Variantele alotipice 53
Variantele idiotipice 54
IgG 55
IgA 57
Structura moleculei de sIgA 58
Functiile efectoare ale sIgA 61
IgM 63
IgE 65
IgD 66
Interactiuni Ag-Ac 67
Bazele moleculare ale interactiunii Ag-Ac 68
Bazele moleculare ale reactiilor imune încrucisate 71
Exemple de reactii imune încrucisate 72

Capitolul 3. **Sistemul imunocitar (limfoid)** 75
Mecanisme de aparare la nevertebrate 76
Organizarea sistemului imunitar la vertebrate 78
Limfocitele 79
Limfocitele B 81
Limfocitele T 83
Receptoul de antigen al limfocitelor T (RCT) 84

Celulele NK 87
Bazele genetice ale diversitatii receptorilor de antigen 88
Mecanismele genetice ale diversitatii imunoglobulinelor 91
Mecanismele genetice ale diversitatii RCTi 98
Dezvoltarea ontogenetica a sistemului imunocitar 100
Rolul bursei lui Fabricius în diferentierea limfocitelor B 103
Diferentierea limfocitelor B la mamifere 104
Timusul la mamifere si rolul lui în diferentierea limfocitelor T 105
Arhitectura timusului 106
Maturarea limfocitelor T în timus 108
Factorii celulari si moleculari ai diferentierii limfocitelor 111
Organele limfoide secundare (periferice) 113
Ganglionii limfatici 116
Splina 119
Sistemul imunitar al mucoaselor 122
Recircularea limfocitelor 128
Bazele moleculare ale fenomenului homing 131
Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor 132
Recircularea limfocitelor în compartimentul tertiar nelimfoid 133

Capitolul 4. **Antigenele complexului major de histocompatibilitate** 136
Structura moleculara a antigenelor CMH clasa I 137
Structura moleculara a antigenelor CMH clasa II 439
Determinismul genetic al moleculelor CMH 140
Evaluarea diferentelor antigenice ale moleculelor CMH 143
Distributia tisulara a moleculelor CMH si semnificatia lor evolutiva 144

Capitolul 5. **Raspunsul imun** 146
Particularitatile generale ale raspunsului imun 147
Etapele raspunsului imun 149
Celulele prezentatoare de antigen 150
Prelucrarea antigenelor 152
Rolul moleculelor CMH în prezentarea antigenelor 154
Antigenele exogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH II 156
Antigenele endogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH I 157

Modelul recunoasterii antigenelor de catre limfocitul T 162
Prezentarea antigenelor în asociatie cu moleculele CD_1 163
Activarea limfocitelor T 164
Activarea limfocitelor B 168
Stimularea nespecifica a limfocitelor B 171
Cooperari celulare în elaborarea raspunsului imun 173
Activarea limfocitelor sub actiunea antigenelor timo-independente 174
Activarea limfocitelor B_1 175
Efectele stimularii antigenice asupra tesutului limfoid secundar 176
Dinamica raspunsului imun mediat humoral 176
Raspunsul imun humoral secundar 178
Factorii care conditioneaza intensitatea raspunsului imun 182
Anticorpi naturali 184
Biosinteza imunoglobulinelor 186
Catabolismul imunoglobulinelor 187

Utilizari ale serurilor imune 188
Imunitatea mediata celular 188
Mediatorii moleculari ai reactivitatii imunitare 196
Interleuchine 198
IL-1 198
IL-2 203
Alte citochine 208
Interferonii si mecanismele actiunii lor 209
Activitati biologice efectoare ale interferonilor 211
Bazele moleculare ale activitatii interferonilor 213
Perspectivele producerii si utilizarii interferonilor 217
Bazele celulare si moleculare ale memoriei imunitare 218
Reglarea raspunsului imun 221
Toleranta imunitara 226
Factorii care conditioneaza inducerea starii de toleranta 229
Toleranta fatului 230

Capitolul 6. **Surse de gamaglobuline omogene** 232
Proteinele de mielom 232
Surse artificiale de gamaglobuline omogene. Tehnologia hibridomului 233
Etapele obtinerii hibridomului 235
Avantajele biotehnologiei hibridomului 239
Aplicatii practice ale AMC 240

Capitolul 7. **Mecanisme de aparare antiinfectioasa** 243
Raspunsul imun specific antiifectios 244
Structura antigenica a celulei bacteriene 244
Mecanisme prin care microorganismele evita apararea gazdei 247
Raspunsul imun în infectiile virale 249
Raspunsul imun primar 250

Rolul anticorpilor în imunitatea antivirala 251
Imunitatea antivirala mediata celular 254
Mecanisme prin care celulele infectate evita efectorii raspunsului imun 257
Tipurile de imunitate dobândita 258
Imunitatea dobândita artificial activ 260
Vaccinurile 260
Vaccinuri de origine bacteriana 261
Vaccinuri virale 262
Imunitatea dobândita artificial pasiv 269
Rezistenta antiinfectioasa înascuta nespecifica 270
Sisteme celulare cu rol în rezistenta antiinfectioasa nespecifica 275
Sistemul fagocitar mononuclear 276
Receptorii membranari ai macrofagului 280
Activarea macrofagului 282
Endocitoza 283
Rolul macrofagului în apararea fata de bacteriile cu localizare intracelulara 288
Alte functii ale macrofagului 291
Sistemul fagocitar polimorfonuclear 292
Diferentierea neutrofilelor 294
Sisteme bactericide active în PMNN 295

Deficiente functionale ale sistemului PMNN 300
Sistemul complement 301
Mecanismul general de activare a sistemului complement 302
Calea clasica de activare a complementului 303
Sistemul de activare enzimatica 304
Calea alterna a fixarii complementului 308
Functiile complementului 310
Proteine reglatoare ale activitatii sistemului complement 313
Epuizarea experimentala a complementului seric 314
Biosinteza componentelor sistemului complement *315*
Rolul complementului în apararea antiinfectioasa 315
Procesul inflamator 317
Diapedeza 318
Chimiotaxia 321
Tipuri de reactii inflamatorii 323
Mediatorii reactiei inflamatorii 324
Rolul citochinelor în procesul inflamator 325
Reactantii de faza cuta 326

Capitolul 8. **Reactii imunitare *in vivo*** 332
1. Reactiile de hipersensibilitate 332
Clasificarea reactiilor de hipersensibilitate 333
Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip I 334
Declansatorii 336
Mediatorii reactiilor de hipersensibilitate de tip I 340
Mecanismul celular si molecular al reactiilor de hipersensibilitate tip I 342
Efectele mediatorilor mastocitari 345
Exemple de stari de hipersensibilitate de tip I 345
Testarea starilor atopice 351
Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip II 352
Aloimunizarea post-transfuzionala 354
Aloimunizarea feto-materna în incompatibilitatea Rh 355
Reactia imunoalergica antieritrocitara determinata de medicamente 356
Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip III 358
Epurarea complexelor imune si cauzele persistentei lor în organism 359
Maladii determinate de complexele imune 362
Modelul experimental al complexelor imune 362
Modelul clinic al maladiei cu complexe imune 364
Reactia de hipersensibilitate de tip IV (Hipersensibilitatea intârziata) 366
Declansatorii reactiilor de hipersensibilitate întârziata 366
1. Reactia de hipersensibilitate întârziata de tip tuberculinic 367
Efectorii celulari ai reactiei de hipersensibilitate întârziata 368
2. Reactia de hipersensibilitate întârziata de tip granulomatos 370
Teste in vivo pentru detectarea hipersensibilitatii întârziate 371
3. Hipersensibilitatea de contact (dermatita de contact) 372
2. Conflictul imunitar. Maladiile autoimune 375
Mecanisme ipotetice ale initierii conflictului autoimun 376
Inducerea experimentala a maladiilor autoimune 378
Mecanisme celulare si moleculare ale progresiei maladiilor autoimune 381
Maladii autoimune ale tesutului conjunctiv (colagenoze) 383
Lupusul eritematos diseminat 383

Artrita reumatoida 386
Biologia moleculara a artritei reumatoide 387
Febra reumatismala 389
Biologia moleculara a maladiilor autoimune cu specificitate de organ 390
Diabetus mellitus insulino-dependent 391
Maladii autoimune tiroidiene 391
Anemia pernicioasa 395
Myasthenia gravis 396
Ciroza biliara primitiva 398
Maladia Addison 399
Boala Crohn si colita ulcerativa 400
Anemiile hemolitice autoimune 400
Purpura trombocitopenica 402
Pemphigus 402

Capitolul 9. **Imunodeficientele** 404
Imunodeficientele înascute 405
Imunodeficientele dobândite 406
Imunodeficienta consecutiva infectiei cu HIV 407

Capitolul 10. **Imunologie tumorala** 410

Antigene tumorale 410
Raspunsul imun antitumoral 416
Efectorii raspunsului imun antitumoral 418
Rolul celulelor NK 419
Citotoxicitatea mediata de macrofage 420
Imunitatea mediata de limfocitele T 421
Mecanisme de scapare a celulelor tumorale 422
Abordari terapeutice ale neoplaziilor 424

Capitolul 11. **Imunitatea în transplantul de tesuturi si organe** 429
Argumente ale rolului reactivitatii imunitare în respingerea grefei 431
Evolutia respingerii grefei de piele 432
Respingerea grefei de rinichi 432
Antigenele declansatoare ale respingerii grefei 433
Teste de histocompatibilitate 436
Xenotransplantarea 437
Imunosupresia 439

Capitolul 12. **Interactiunile sistemului imunitar cu sistemul neuroendocrin** 442
Rolul hormonilor corticosteroizi în reglarea functiei imunitare 444
Rolul sexosteroizilor 445
Factorii neuroendocrini favorizanti ai maladiilor autoimune umane 447
Bibliografie 449

CUVÂNT ÎNAINTE

Imunologia este unul dintre domeniile cele mai dinamice ale stiintelor biologice. Functia imunitara este esentiala pentru organismul uman si animal si de aceea, disfunctiile imunitare severe sunt incompatibile cu supravietuirea. Pe de alta parte, activarea neadecvata a functiei imunitare are drept consecinta initierea sau progresia starilor patologice de hipersensibilitate si a maladiilor autoimune, ceea ce a amplificat interesul pentru studiul Imunologiei.

Aceasta lucrare este intitulata *Imunologie si Imunochimie*, pentru ca accentueaza în mod deosebit, studiul reactantilor fundamentali ai imunitatii: antigene si anticorpi. Lucrarea prezinta într-o forma didactica, foarte accesibila, mecanismele moleculare ale reactivitatii imunitare în diferitele sale ipostaze: raspunsul imun fata de antigene moleculare, antigene de natura infectioasa, autoantigene, antigene tumorale sau antigene de transplantare.

Continutul acestei lucrari este rezultatul cautarilor de-a lungul mai multor ani si a încercarii de a prezenta într-o forma concisa, coerenta si unitara, problematica majora a Imunologiei, în contextul dovezilor tot mai numeroase si mai convingatoare, ca functia imunitara are nu numai rolul clasic de aparare antiinfectioasa, ci este într-o continua expansiune a implicarii sale, atât în mentinerea homeostaziei chimice a organismului, cât si în numeroase stari patologice.

Imunologie si Imunochimie este titlul unei lucrari care si-a propus ca deziderat, sa consolideze un mod de gândire si de întelegere a functiei de aparare ca o functie biologica esentiala, a carei activare are nu numai efecte benefice, dar uneori genereaza manifestari patologice, asa cum sunt *reactiile de hipersensibilitate* si conflictele imunitare care stau la baza progresiei *maladiilor autoimune*.

În constructia lucrarii *Imunologie si Imunochimie* am pornit de la volumul “Imunobiologie” si de la captivantele cursuri tinute, la începuturile Imunologiei în Facultatea de Biologie a Universitatii Bucuresti, de Domnul Academician Profesor Doctor Docent G. ZARNEA, caruia îi aduc un respectuos omagiu pentru generozitatea efortului constructiv al Domniei Sale, investit în dezvoltarea disciplinelor microbiologice.

Lucrarea *Imunologie si Imunochimie* este materializarea eforturilor de actualizare si conectare cât mai trainica a domeniului, la realitatile stiintifice ale momentului.

Lucrarea se adreseaza tuturor studentilor si absolventilor mai noi, dar mai ales celor vechi, ai facultatilor de *Biologie, Medicina umana si Medicina veterinara*, precum si specialistilor ale caror preocupari profesionale, practice sau teoretice, interfera cu domeniul Imunologiei.

Tin sa multumesc anticipat tuturor acelora care vor studia lucrarea *Imunologie si Imunochimie* si vor face observatii critice întemeiate, de care voi tine seama într-o viitoare editie a acestei carti.

Autorul

INTRODUCERE

Imunologia studiaza, în primul rând, functia de aparare a organismului uman si animal, care face parte din categoria functiilor de *relatie* si este *esentiala* pentru supravietuire. Sistemul imunitar este esential pentru supravietuirea organismelor multicelulare, datorita agresiunii permanente a agentilor infectiosi (microorganisme si virusuri). Omul adult poarta pe suprafata mucoaselor si a tegumentului, un numar urias de celule bacteriene (circa 10^{14}), mai multe decât propriile celule, unele având potentialul de a initia procese infectioase.

Disfunctia severa congenitala sau dobândita a functiei imunitare este incompatibila cu viata.

Termenul de imunitate are o provenienta sociala: în Roma antica, persoanele scutite de impozite catre stat, erau considerate “imune”. Sensul termenului s-a extins, ulterior desemnând persoanele scutite de a suferi efectele infectiei cu agenti patogeni.

Imunologia s-a nascut si s-a dezvoltat ca un domeniu al *Microbiologiei*, bazându-se pe cunostiintele si conceptele *Patologiei* si *Biochimiei*.

În sensul *clasic*, restrâns al notiunii, Imunologia studiaza reactivitatea organismului animal si uman, consecutiv contactului cu agentii patogeni, mecanismele elaborarii raspunsului imun, precum si particularitatile tesuturilor, celulelor si moleculelor care conditioneaza starea de imunitate. In sens clasic, notiunea de imunitate defineste *starea de nereceptivitate* sau de rezistenta a organismului fata de un agent patogen infectios, în situatia în care sunt îndeplinite conditiile pentru aparitia unei maladii infectioase. Din acest motiv, Imunologia s-a dezvoltat ca un domeniu al *Microbiologiei*.

În conceptia clasica, s-a considerat ca activarea functiei imunitare are un efect exclusiv benefic, protector pentru organism.

În conceptia moderna, functia imunitara se defineste ca o proprietate biologica esentiala a organismului uman si animal, care consta în capacitatea de a diferentia rapid si specific, substantele proprii de cele straine.

Sistemul imunitar este tolerant fata de substantele proprii, deoarece “a învatat” sa le recunoasca în timpul vietii embrionare, dar este dotat cu proprietatea de a recunoaste si de a diferentia prompt substantele straine, fata de care se activeaza si le îndeparteaza din organism.

Toleranta imunitara este rezultatul unui proces de selectie a clonelor de limfocite, selectie ce are loc în perioada dezvoltarii embrionare a limfocitelor, ele fiind celulele efectoare ale raspunsului imun. Selectia consta în eliminarea clonelor de limfocite potential autoreactive (potential reactive fata de moleculele proprii)

Componentele chimice proprii organismului, pe care sistemul imunitar le tolereaza, sunt incluse în notiunea de "self" (*self*, englez = propriu), iar cele straine, care se abat de la structura chimica programata genetic a organismului, poarta denumirea de *substante nonself* sau *antigene*. Astfel, *functia imunitara este o functie biologica esentiala, prin intermediul careia organismele diferentiaza prompt si cu mare sensibilitate, componentele self de substantele nonself.*

Functia imunitara are un rol determinant pentru pastrarea homeostaziei mediului intern si a individualitatii chimice a fiecarui organism, prin faptul ca sistemul imunitar recunoaste si tolereaza moleculele proprii, dar se activeaza la contactul cu substantele straine care se abat de la programul biochimic tolerat.

Dupa ce învata sa tolereze self-ul, chiar din perioada dezvoltarii embrionare, functia imunitara realizeaza un permanent "control de calitate" a moleculelor self.

Asa cum aparatul genetic asigura stabilitatea si integritatea unei specii ca sistem biologic, sistemul imunitar asigura pastrarea homeostaziei biochimice a organismului.

Functia imunitara este mediata de molecule cu rol de receptori de pe suprafata *limfocitelor* si de molecule solubile în umorile organismelor.

Obiectul de studiu al Imunologiei s-a diversificat odata cu progresul general al stiintelor biologice si în special, odata cu aprofundarea cunoasterii functiei de aparare. Începând din anii '60, interesul stiintific pentru Imunologie a crescut considerabil din doua motive:

1) În primul rând s-a demonstrat ca functia imunitara este *esentiala* pentru organism, insuficienta sa marind riscul infectiilor cu microorganisme patogene sau potential patogene, iar disfunctia imunitara severa este incompatibila cu viata.

2) S-a demonstrat ca activarea functiei imunitare nu este totdeauna benefica pentru organism, ci uneori, stimularea ei determina leziuni tisulare severe, chiar ireversibile, asociate cu *starile de hipersensibilitate* sau initiaza evolutia unor stari patologice grave, ca de exemplu, *maladiile autoimune.* Exemplul clasic este oferit de infectia cu *Mycobacterium tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Leziunile tisulare, materializate în existenta granuloamelor, se datoreaza chiar raspunsului

imun, care este asa de amplu încât produce manifestarile patologice.

Starile de hipersensibilitate definesc o stare de reactivitate imunitara crescuta si se caracterizeaza prin aceea ca, la primul contact cu o substanta nonself, nu se produce un raspuns imun detectabil, ci organismul dobândeste o stare speciala de *sensibilizare imunitara* fata de un antigen. La contactul secundar ulterior, chiar cu cantitati foarte mici ale antigenului sensibilizant, organismul raspunde cu manifestari patologice de intensitati variabile, al caror rezultat final poate fi fatal. Asa se întâmpla în starile de hipersensibilitate (alergii) la polen, la diferite medicamente (de exemplu, penicilina), la veninul insectelor sau la diferite substante alimentare. Modificarile patologice consecutive alergiilor pot fi locale sau generalizate.

Un domeniu vast, în continua expansiune, dar relativ recent al Imunologiei îl constituie *maladiile autoimune*. In esenta, maladiile autoimune semnifica întreruperea starii de toleranta perfecta pe care sistemul imunitar o manifesta fata de componentele self. Datorita unor stari fiziologice legate de procese de îmbatrânire, unor procese infectioase, datorita unor procese patologice degenerative sau ca urmare a utilizarii substantelor medicamentoase, în organism se produc modificari chimice tisulare care sunt detectate de celulele sistemului imunitar. Consecinta este declansarea unui raspuns imun fata de componentele self modificate chimic. Astfel se initiaza un conflict autoimun, în cursul caruia sistemul imunitar genereaza efectorii sai – *celule activate si molecule* – care recunosc specific moleculele self modificate.

Respingerea grefelor de tesuturi si organe este consecinta activarii functiei imunitare. Antigenele tesutului grefat, solubile sau fixate pe suprafata celulelor din grefa, activeaza limfocitele (celulele efectoare ale raspunsului imun). Autografele sunt totdeauna tolerate. În conditiile unei reactivitati imunitare normale, alografele si xenografele sfârsesc prin a fi respinse. Cu cât diferentele genetice si implicit biochimice între organismul donor si cel receptor de grefa sunt mai accentuate, cu atât grefa este respinsa mai repede.

Etapele dezvoltarii Imunologiei ca stiinta

Imunologia este o stiinta relativ tânara, care a aparut initial ca un domeniu a Microbiologiei, care la începuturile sale a studiat mecanismele reactiilor de aparare a organismului uman si animal fata de agresiunea infectioasa. Imunologia a fost fundamentata de

descoperirile lui Pasteur si Metchnikoff si pastreaza înca legaturi de esenta cu disciplina mama - Microbiologia, desi astazi ea este una dintre ramurile cele mai importante si mai dinamice ale stiintelor biologice.

Aparitia Imunologiei ca stiinta a fost precedata cu milenii, de *observatii empirice* referitoare la faptul ca vindecarea unor maladii infectioase era urmata de o stare de rezistenta permanenta la reinfectie sau cel mult de forme usoare de îmbolnavire. Cu 2-3 secole î.C., în China si India s-a observat ca unele maladii foarte grave (variola, pesta, ciuma), lasa în urma o stare de rezistenta permanenta la reinfectie sau cel mult, persoanele faceau forme foarte usoare de îmbolnavire.

În infectia variolica, apar leziuni caracteristice mai ales pe tegumentul fetei. Mai întâi apar vezicule mici, pline cu lichid clar, al caror continut se tulbura datorita infiltratului celular si fac crusta, iar dupa vindecare, lasa o cicatrice ce se pastreaza toata viata (varsat de vânt). S-a trecut la infectarea artificiala a persoanelor sanatoase în scopul declansarii unei îmbolnaviri usoare, care sa instaleze starea de imunitate. Practica *variolizarii* prin prizarea pe nas a mojaratului de cruste uscate, recoltate de la cei trecuti prin boala, era însotita de infectii grave, datorita cantitatii mari de virus inhalat.

În 1418, procedeul variolizarii a fost introdus în Anglia de Mary Wortley Montagu si s-a practicat o perioada, cu toate riscurile îmbolnavirii cu severitate necontrolata.

Vaccinarea antivariolica a fost introdusa de E. Jenner (1796). Ca vaccin, el a utilizat un virus de la bovine (cowpox). Metoda s-a bazat pe observatia empirica a rezistentei în cursul marilor epidemii de variola, a mulgatorilor care fusesera infectati cu virusul cowpox. Acesta, produce o infectie pustulara si fiind înrudit antigenic cu virusul variolei, confera protectie antivariolica. Vaccinarea persoanelor sanatoase s-a facut cu lichidul recoltat din pustulele de pe ugerul vacilor.

Perioada stiintifica a Imunologiei a fost inaugurata de L. Pasteur, prin descoperirea unor *vaccinuri* cu o larga aplicatie practica. Denumirea de “vaccin” a fost data de Pasteur, în amintirea produsului recoltat de Jenner din leziunile de pe ugerul vacii. Denumirea s-a pastrat pentru toate produsele folosite în practica, pentru a crea o stare de rezistenta preventiva fata de eventualul contact cu agentul patogen.

Pasteur a fundamentat stiintific practica producerii si utilizarii *vaccinurilor*. El a demonstrat ca proprietatile biologice (patogenitatea si virulenta) bacteriilor si virusurilor patogene nu sunt fixe. In anumite conditii, aceste proprietati se pot diminua prin anumite artificii de tehnica, asa încât un agent virulent care de regula determina o infectie mortala, poate fi transformat într-un agent care produce o infectie usoara, fara semne clinice, dar creeaza o rezistenta foarte solida.

Vaccinurile atenuate îndeplinesc aceste deziderate. Pasteur a atenuat virulenta agentilor patogeni prin doua metode: prin *învechirea culturilor* si prin *cultivarea la temperaturi ridicate.* Pasteur a descoperit trei vaccinuri: al holerei gainilor, al antraxului la ovine si al rabiei.

Agentul patogen al *holerei gainilor – Yersinia pestis* – este o bacterie foarte virulenta. Un inocul de câteva celule este suficient pentru a produce îmbolnavirea si moartea organismelor sensibile. Cultura virulenta de *Yersinia*, prin mentinere la temperatura camerei (învechire) se atenueaza si dupa inoculare la gainile normale, nu mai produce îmbolnavirea. Pasarile inoculate cu cultura bacteriana atenuata, devin rezistente la reinfectia cu o cultura virulenta, spre deosebire de pasarile lotului martor, care se îmbolnavesc si mor. Cultura bacteriana veche a creat o stare de imunitate, adica a avut rolul unui *vaccin*. Atenuarea virulentei prin învechirea culturii este un proces necontrolat si probabil se datoreaza modificarilor biochimice sau genetice ale celulelor, sub influenta produselor de catabolism acumulate în mediul de cultura sau se datoreaza epuizarii mediului în substantele esentiale pentru crestere.

Agentul patogen al *infectiei carbunoase* (anthrax) este *Bacillus anthracis*, o bacterie sporulata. Sporul se formeaza la 37^{o}. Cultura bacteriana crescuta la 42^{o}, îsi modifica proprietatile biologice, pierde capacitatea de sporulare (devine asporogena). Aceste modificari se însotesc de pierderea progresiva a virulentei. Incubarea la 42^{o} este o modalitate a obtinerii dintr-o cultura virulenta, a unei culturi cu virulenta progresiv atenuata pentru organismul gazda(oaie, iepure, cobai, soarece).

Carbunele este o boala grava a oilor, ce se transmite si la om. Pasteur a imaginat o schema de vaccinare a ovinelor, începând cu un inocul bacterian virulent pentru soarece si continuând cu inocul bacterian cu virulenta mai mare. A creat o stare de imunitate a ovinelor, carora le-a conferit rezistenta la bacteriile foarte virulente.

Agentul infectios al *rabiei* nu a fost evidentiat de Pasteur. Autorul a utilizat tesut nervos medular sau creier de la iepurele infectat experimental, pe care l-a modificat prin uscare în prezenta potasei caustice. A obtinut un vaccin care, administrat cât mai repede dupa muscatura animalului rabid, creeaza o stare de rezistenta, în absenta careia infectia rabica evolueaza invariabil spre moarte.

Cercetarile lui Pasteur au pus bazele *Imunologiei medicale* si ale obtinerii si utilizarii pe baze stiintifice a *vaccinurilor*. A urmat o perioada în cursul careia s-au înregistrat progrese importante în obtinerea si administrarea vaccinurilor.

Bazele conceptului *imunitatii humorale* au fost puse de Behring si

Kitasato (1890), care au evidentiat anticorpii serici, dupa imunizarea animalelor de laborator. Serurile imune pot fi folosite în scop *terapeutic* pentru a stopa sau a atenua evolutia unei boli infectioase, cu conditia ca administrarea acestor seruri sa fie foarte precoce. In 1923, Behring a organizat productia de seruri imune, preluata de Institutul Pasteur din Paris (înfiintat în 1894) si apoi de Institutul Babes si de Institutul Cantacuzino.

În 1894, Pfeiffer a descris fenomenul de *bacterioliza*, demonstrând ca serul sanguin al animalelor imunizate are proprietatea de a provoca liza celulelor bacteriene. El a demonstrat ca bacterioliza necesita doua componente: serul sanguin al animalului imunizat si o picatura de ser proaspat de cobai. Procesul este foarte specific: serul produce numai liza celulelor bacteriene care au specificitate fata de anticorpii serici.

J. Bordet a evidentiat ca fenomenul lizei se produce si în cazul hematiilor, daca sunt puse în contact cu serul sanguin de la iepurele imunizat cu hematii, la care se adauga ser proaspat de cobai, în care se gaseste complementul (alexina).

Conceptul *imunitatii mediate celular* a fost formulat de Metchnikoff (1891). El a evidntiat ca în organism exista o serie de celule specializate, cu capacitatea de a recunoaste celulele straine si de a le îngloba prin procesul de fagocitoza, care sunt digerate si eliminate din celula fagocitara. Metchnikoff a facut observatii pe crustaceul *Daphnia magna*, ale carui celule fagocitare înglobeaza si digera sporii fungici (*Monospora bicuspidata*). Când infectia cu spori este masiva, capacitatea de aparare a organismului este depasita si gazda moare.

Cele doua doctrine ale fenomenului imunitar, care s-au confruntat prin reprezentantii lor, au fost unificate de Wright (1903). El a demonstrat existenta în ser a unor anticorpi naturali denumiti *opsonine*, care actioneaza în cooperare cu *fagocitele.*

În 1930, K. Landsteiner a evidentiat o structura antigenica pe suprafata hematiilor umane si a stabilit existenta sistemului antigenic ABO, precum si a normelor ce trebuie respectate în practica *transfuziei* de sânge.

Ramon (1925) a demonstrat ca unii agenti patogeni (ca de exemplu, al difteriei, al tetanosului) produc toxine foarte puternice. Aceste toxine au un potential foarte ridicat: cantitati foarte mici de toxine sunt suficiente pentru a provoca moartea animalelor de experienta. Tratarea preparatului de toxina cu formol 4‰ si mentinerea amestecului la 39^{o} pentru o perioada de timp, este urmata de pierderea completa a proprietatilor toxice. Preparatul atoxic este inofensiv si poate fi administrat în cantitati relativ mari, fara sa determine efecte

patologice. Preparatul atoxic îsi pastreaza proprietatile imunogene si induce o stare de rezistenta a organismelor imunizate. Sub actiunea combinata a formolului si temperaturii, toxinele difterica si tetanica au fost transformate în *anatoxine*.

Cercetarile de biochimie(1930-1950) au permis elucidarea structurii moleculare a antigenelor, a imunoglobulinelor si a haptenelor.

Studiul *mecanismelor celulare* ale proceselor imunitare (1950-1980) este marcat de progresele biologiei moleculare si de interferenta cu *Virologia, Microbiologia, Biologia celulara, Biofizica*, *Biochimia, Genetica*. S-a evidentiat rolul esential al *limfocitului* în fenomenele imunitare, precum si rolul plasmocitelor în sinteza si secretia anticorpilor.

Mc Farlane Burnet (1959) a elaborat *teoria selectiei clonale* a raspunsului imun, iar J.F.A.P.Miller (1960) a stabilit rolul esential al timusului în dobândirea competentei functionale a limfocitelor T.

R. Good (1960) a evidentiat rolul *bursei lui Fabricius* în geneza sistemului imunitar la pasari.

J. Dausset (1954) a demonstrat ca pe suprafata celulelor oricarui organism se gaseste o serie de molecule (antigene), care confera fiecarui organism o individualitate antigenica unica. Datorita acestor antigene, reactiile care sunt determinate de o grefa de tesut sau de organ, pot evolua în mod diferit: între organismele foarte înrudite, grefa prinde foarte bine, iar o grefa între organisme cu diferente majore de ordin genetic, produce o reactie de respingere, care este cu atât mai rapida cu cât diferentele antigenice sunt mai mari. Antigenele suprafetei celulare care confera individualitate biochimica unica fiecarui organism, se numesc *antigene de histocompatibilitate*. Evaluarea diferentelor celor doi parteneri (donor si receptor) în ceea ce priveste moleculele de histocompatibilitate, este esentiala înainte de grefarea organului.

Dupa 1970, studiul sistemului imunitar corespunde unei abordari integratoare. Dupa opinia lui N. K. Jerne (1985), “imunologia si-a pierdut statutul de disciplina izolata, fiind pe cale de a fi absorbita de biologia clasica”.

Dupa 1980, Imunologia s-a diversificat si s-a aprofundat, dar în acelasi timp este mai unificata ca oricând, sub imperativul numitorului comun al întelegerii functiei imunitare la nivel *molecular*. Abordarile moleculare vor sta la baza tuturor cercetarilor viitoare, legate de functia imunitara.

În perspectiva, orizontul de evolutie a Imunologiei se extinde asupra întelegerii genelor codificatoare ale moleculelor efectoare si reglatoare ale raspunsului imun si ale mecanismelor actiunii lor. Astfel

vom întelege diferentierea limfocitelor, activarea lor, mecanismele sintezei, secretiei, recircularii limfocitelor si mecanismele actiunii moleculelor efectoare. Ar urma utilizarea cunostiintelor imunologice pentru prevenirea maladiilor cu substrat imunitar (alergii, maladii autoimune), pentru prevenirea respingerii grefelor de tesuturi si organe si pentru imunoterapia neoplaziilor. Va fi o perioada a reîntoarcerii aplicarii Imunologiei moleculare, la nivelul întregului organism.

Diviziunile Imunologiei

Imunologia s-a nascut ca un domeniu al Microbiologiei si s-a dezvoltat ca un domeniu al *Bacteriologiei medicale*, cu care a ramas în raporturi de dependenta pâna catre anul 1960. Treptat însa, prin acumularea unui volum mare de date stiintifice care au demonstrat interventia functiei imunitare si a reactiilor imune în numeroase fenomene normale si patologice, Imunologia a devenit *o stiinta de sine statatoare*. Consecinta fireasca a implicarii functiei imunitare într-o multitudine de procese normale si patologice, a fost aceea ca din domeniul Imunologiei s-au desprins *ramuri* care, la rândul lor, tind sa aiba o existenta autonoma.

Imunobiologia este cea mai cuprinzatoare dintre ramuri. Ea studiaza fenomenele imunitare ca manifestari ale unei functii biologice esentiale – functia de aparare. Studiaza substratul biologic al raspunsului imun (celulele imunitare, originea si mecanismele diferentierii lor, factorii celulari si humorali care asigura diferentierea lor), mecanismele celulare si moleculare ale biosintezei anticorpilor, explica implantarea celulelor tumorale si geneza cancerului clinic în conditiile actiunii efectorilor sistemului imunitar. Studiaza mecanismele imunitare ale respingerii grefelor de tesuturi si organe, mecanismele reactivitatii imunitare în filogenie si ontogenie, precum si bazele celulare si moleculare ale starilor de hipersensibilitate si ale maladiilor autoimune.

Imunochimia este o disciplina de granita ce apartine *Imunologiei si Biochimiei*, care studiaza functia imunitara sub aspect biochimic. Preocuparea esentiala a constat în studiul chimiei antigenelor si anticorpilor si al mecanismului lor de interactiune în reactia antigen-anticorp. Datele referitoare la structura chimica a antigenelor si anticorpilor au pus bazele Imunochimiei, dar ulterior, domeniul si-a largit sfera de activitate si studiaza urmatoarele aspecte:

- factorii moleculari ai raspunsului imun si în special ai imunitatii mediate celular;
- moleculele de histocompatibilitate;

– markerii antigenici specifici diferitelor populatii de celule limfoide;

– moleculele cu functie de receptor de antigen, pe suprafata celulelor limfoide;

– factorii de cooperare celulara în cursul elaborarii raspunsului imun (interleuchine);

– componentele complementului etc.

Termenul de *Imunochimie* a fost introdus de chimistul suedez Arrhenius (1907). El si-a intitulat astfel studiul cu privire la reactiile chimice care se produc în organismul uman si animal, dupa imunizare. Fondatorul Imunochimiei este P. Ehrlich. El a introdus metode cantitative în studiul reactiilor antigen-anticorp si a elaborat o teorie generala asupra recunoasterii imune (teoria catenelor laterale sau a receptorilor). Dupa 1950, Imunochimia s-a dezvoltat spectaculos, datorita descoperirilor din domeniul biochimiei, datorita utilizarii unor metode fizico-chimice de analiza a macromoleculelor si prin aplicarea acestora la domeniul Imunologiei. S-a nascut un set de metode, în esenta biochimice, puse în slujba analizei moleculelor implicate în functia imunitara. Domeniul s-a numit *analiza imunochimica* si utilizeaza metode care deriva din îmbinarea tehnicilor fizico-chimice cu cele imunologice. Imunochimia este deservita de metoda *imunodifuziei, imunofluorescentei, RIA, ELISA, dializa la echilibru* etc. Efectul utilizarii acestor metode de investigare a fost cunoasterea mecanismelor moleculare care stau la baza raspunsului imun, îndeosebi humoral si aplicarea în laboratorul clinic, a unor noi metode de diagnostic.

În clinica, studiile de Imunochimie au propus noi metode de tratament, bazate pe interactiunea unor molecule cu rol de vehicul pentru anticorpi, cu receptorii unor celule tinta (imunotoxine).

Imunogenetica studiaza determinismul genetic al raspunsului imun: mecanismele genetice care asigura diversitatea anticorpilor si a antigenelor de histocompatibilitate.

Imunohematologia s-a nascut odata cu stabilirea diferentelor antigenice ale eritrocitelor umane si cu precizarea grupelor sanguine (K. Landsteiner, 1901) si s-a dezvoltat dupa ce s-a stabilit existenta unor diferente fine între diferite tipuri de eritrocite si, în special, dupa descoperirea factorului Rh si a rolului sau în patologia sarcinii.

Imunologia medicala umana si veterinara s-a dezvoltat în trei directii:

– *directia profilactica*, orientata spre descoperirea si producerea unor noi vaccinuri, capabile sa creeze o stare de rezistenta. Ea se preocupa, de asemenea, de schemele de vaccinare, de posibilitatea asocierii diferitelor vaccinuri si de posibilitatea stimularii raspunsului

imun cu ajutorul adjuvantilor;

– *directia terapeutica* studiaza posibilitatea obtinerii serurilor imune. Ele contin anticorpi si se administreaza organismelor care prezinta riscul îmbolnavirii prin infectii;

– *directia diagnosticului* studiaza posibilitatea identificarii agentilor etiologici ai diverselor maladii infectioase, cu ajutorul reactantilor imunologici (seruri imune si antigene).

Imunopatologia studiaza fenomenele imunitare în relatie cu diferite maladii. In multe situatii patologice, raspunsul imun (activarea functiei imunitare) are efecte defavorabile, prejudiciante asupra organismului. Raspunsul imun se instituie drept cauza, dar în special ca mecanism, pentru producerea unor manifestari patologice. Afectiunile generate de activarea sistemului imunitar (imunopatii) se grupeaza în doua categorii:

– starile de hipersensibilitate(alergiile);

– maladiile autoimune.

Imunopatologia studiaza, de asemenea, *imunodeficientele* (înascute si dobândite), *imunitatea de transplant* si *imunitatea antitumorala, raspunsul imun în maladiile infectioase virale si bacteriene*, precum si în *maladiile parazitare.*

Serologia (Imunoserologia) s-a dezvoltat ca o ramura practica, dedicata studiului tehnicilor de explorare a reactiilor imune *in vitro*.

Capitolul 1

CARACTERIZAREA GENERALA A ANTIGENELOR

GR. MIHAESCU, CAMELIA MIHAESCU

Conventional, antigenele se definesc ca substante straine, care, consecutiv introducerii în organismul uman sau animal pe o *cale parenterala* (alta decât cea digestiva), declanseaza sinteza anticorpilor cu care se combina specific. Definitia este incompleta din câteva motive.

1. Calea *digestiva* de administrare a antigenelor nu exclude totdeauna posibilitatea declansarii raspunsului imun. Pentru agentii infectiosi care se multiplica în tractul digestiv, administrarea orala asigura o buna imunizare (de exemplu, vaccinul polio se administreaza oral, desi calea parenterala este mai eficienta).

2. Unele substante nonself sunt în mod eronat considerate ca neantigenice, deoarece, desi *in vivo* stimuleaza reactivitatea imunitara si induc sinteza unei cantitati mici de anticorpi, *in vitro* nu produc reactii vizibile antigen-anticorp.

3. Fata de unele antigene, organismele nu declanseaza raspunsul imun, ci manifesta o stare de toleranta.

4. Unele molecule în stare nativa nu induc un raspuns imun, ci numai dupa cuplarea covalenta cu o molecula purtator. Molecula nativa îsi pastreaza proprietatea de a se combina specific cu anticorpii sintetizati. Astfel de molecule se numesc *haptene*.

J. F. Bach (1976) defineste *antigenele* ca fiind *molecule care, consecutiv introducerii în organism pe o cale adecvata, induc un raspuns imun materializat prin proliferarea celulelor limfoide si sinteza moleculelor de recunoastere (anticorpi si receptori celulari), cu care se combina in vivo si in vitro.*

Modelul general de structura a unui antigen

O molecula antigenica este alcatuita din doua componente;

– componenta *purtator* (“carrier”), care corespunde celei mai mari parti a moleculei:

gruparile determinante de specificitate sau *epitopi*, localizate pe suprafata componentei purtator si formate din secvente specifice de monomeri. Epitopii, prin secventa proprie a monomerilor si prin configuratia spatiala specifica, confera individualitate chimica si specificitate antigenica moleculei nonself. Gruparile determinante de specificitate sunt echivalentii moleculari si functionali ai *haptenei*.

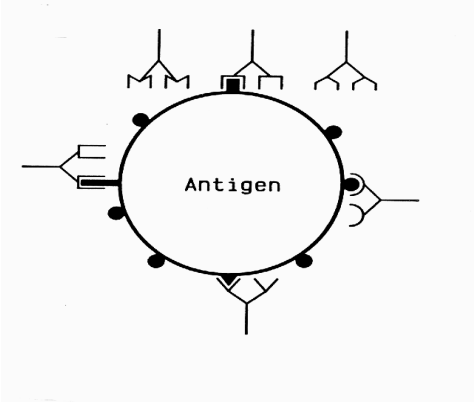


Fig. 1. Modelul general de *structura a unui antigen*. Cea mai mare parte a oricarei molecule antigenice este reprezentata de gruparea *carrier*, pe care sunt localizati *epitopii* cu diferite configuratii spatiale, stimulatori ai reactivitatii imunitare. Unii epitopi pot fi unici, iar altii sunt multipli. Uneori, epitopii stimuleaza sinteza anticorpilor cu afinitati diferite.

Gruparile determinante de specificitate se gasesc în numar variabil pe suprafata purtatorului si pot fi *identice* atât în ceea ce priveste compozitia chimica, cât si configuratia spatiala (ca în cazul antigenelor polizaharidice cu epitopi repetitivi) sau sunt *diferite,* atât ca secventa a monomerilor cât si în privinta configuratiei spatiale.

Proprietatile definitorii ale antigenelor

În studiile experimentale asupra imunogenitatii unor molecule sintetice, M. Sela (1969) a descris doua proprietati esentiale ale antigenelor:

1. *Imunogenitatea* sau *antigenitatea* este proprietatea unui antigen complet, format din gruparea carrier si epitopi, de a declansa un raspuns imun, humoral sau celular, ori de câte ori patrunde în organism pe o cale adecvata. Proprietatea de imunogenitate este asociata cu gruparea *carrier* a moleculei de antigen, grupare care într-o oarecare

masura influenteaza si specificitatea anticorpilor.

2. *Specificitatea* defineste capacitatea antigenului întreg sau numai a epitopilor sai de a se combina specific cu anticorpii sau cu receptorii celulari a caror sinteza a fost indusa. Proprietatea de specificitate este dependenta, în primul rând de *epitopi*, dar este influentata într-o masura mai mare sau mai mica si de gruparea carrier.

Notiunea de *imunogen,* uneori, este distincta de aceea de *antigen*. Notiunea de *imunogen* este mai restrictiva si semnifica proprietatea unei substante, în stare nativa, de a stimula raspunsul imun, fara sa necesite conjugarea cu o alta molecula.

Notiunea de *antigen* este mai larga, deoarece desemneaza molecule nonself care sunt imunogene în stare nativa sau devin imunogene dupa conjugarea cu o molecula purtator. *Antigenul* poate fi uneori inacapabil, în forma sa nativa, sa stimuleze raspunsul imun.

Clasificarea şi imunogenitatea antigenelor

Dupa originea lor, antigenele sunt *exogene* si *endogene*.

Antigenele exogene sunt cele mai numeroase si pot fi împartite în trei categorii: 1) *naturale*; 2) *artificiale*; 3) *sintetice*.

Antigene naturale

Antigenele naturale formeaza categoria cea mai cuprinzatoare. Aici sunt incluse toate macromoleculele naturale din virusuri, microorganisme, fungi, plante si animale.

Dupa dimensiuni se disting *antigene moleculare* (“solubile”) si *antigene corpusculare*.

Antigenele moleculare (solubile) constituie gruparea cea mai numeroasa, care include toate tipurile de macromolecule: *proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici*.

Antigenele corpusculare (“insolubile”) sunt reprezentate de virusuri si de celule (procariote si eucariote).

Antigenele moleculare

Cele mai studiate antigene sunt proteinele si polizaharidele, la care se adauga conjugatele: glicoproteine, nucleoproteine, lipoproteine, peptidoglicani, glicolipide.

Proteinele sunt cele mai numeroase si mai importante antigene

moleculare. Diversitatea lor chimica, generata de variatia secventei de aminoacizi este uriasa. Practic, fiecare tip de molecula proteica nonself din lumea vie este un antigen pentru organismul animal si uman, deoarece are o secventa unica de aminoacizi, care determina o structura secundara si tridimensionala proprie si implicit, existenta unor epitopi proprii ca secventa a aminoacizilor si conformatie spatiala.

Imunogenitatea este o proprietate generala a proteinelor, a celor cu *rol structural* (colagenul, cheratina, elastina, fibroina viermelui de matase, proteinele capsidei virale), a celor cu *rol functional* (miozina, actina, albumina, hemoglobina, mioglobina, enzime, hormoni, imunoglobuline), a celor cu *rol de depozit* de aminoacizi(ovalbumina, cazeina, gliadina – din semintele de grâu). Toate proteinele si polipeptidele cu o greutate moleculara mai mare de 1000 D sunt imunogene, într-o masura mai mare sau mai mica.

De cele mai multe ori, pentru antigenele proteice, nu se face distinctia dintre epitopii inductori ai raspunsului imun si gruparea carrier, deoarece proteinele poseda un spectru *continuum de determinanti antigenici*, ce corespund unor secvente discrete ale suprafetei moleculare localizate în zonele cele mai expuse contactului cu receptorii sistemului imunitar. Antigenitatea moleculelor *globulare* este determinata adeseori, de configuratia lor spatiala, rezultata din plierea tridimensionala. Pentru cele mai multe proteine globulare (mioglobina, hemoglobina, lizozimul, ribonucleaza etc.), aproape toti determinantii antigenici sunt *conformationali*, adica sunt rezultatul plierii spatiale a moleculei, iar altii sunt *secventiali*, adica sunt reprezentati de o secventa particulara de aminoacizi. Moleculele proteice *fibrilare* (cheratina, colagenul, fibroina) au configuratii mai simple decât cele globulare, catenele lor fiind aranjate sau rasucite pe o singura dimensiune. Determinantii antigenici ai acestor proteine sunt *secventiali*, formati din 3-6 aminoacizi.

Sistemul imunitar al unui organism recunoaste un numar limitat de determinanti antigenici ai unei molecule proteice. Epitopii, conformationali sau secventiali, care stimuleaza raspunsul imun *in vivo*, iar *in vitro* induc proliferarea limfocitelor, se numesc *epitopi dominanti*. O parte a determinantilor antigenici ai unei molecule native, cel mai adesea, sunt neimunogeni (imunosilentiosi), nefiind accesibili sistemului imunitar al organismului, dar se pot exprima într-un anumit set de conditii de imunizare (gazda, adjuvant etc.). Acestia sunt *epitopi interni* ai proteinelor globulare. Un determinant intern poate fi silentios în molecula nativa, dar devine imunostimulator dupa clivarea enzimatica a moleculei, *in vivo* sau *in vitro*. De aceea, M. Sela a recomandat

utilizarea termenului de “grupare imunodominanta”, pentru epitopul sau epitopii care se exprima în anumite conditii(gazda, adjuvant, cale de administrare) si determina specificitatea raspunsului imun.

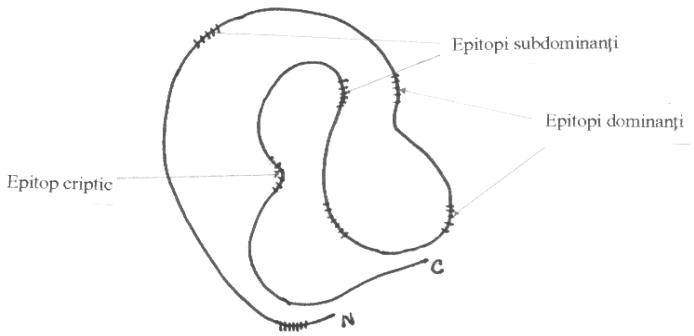


Fig. 2. *Epitopii dominanti* sunt localizati la suprafata moleculei globulare. *Epitopii subdominanti* devin accesibili dupa clivarea moleculei în etapa prelucrarii în macrofag, iar *epitopii criptici* sunt inaccesibili fenomenului de recunoastere imunitara.

Imunogenitatea antigenelor proteice se modifica în diferite conditii.

Denaturarea moleculelor native sub actiunea agentilor chimici si a caldurii, *modificarea configuratiei* moleculei sub actiunea agentilor reducatori sau *hidroliza enzimatica*, modifica imunogenitatea. Anticorpii specifici fata de proteina nativa precipita slab sau de loc proteina denaturata termic sau chimic.

Formaldehida si *glutaraldehida* sunt agenti de legare încrucisata a moleculelor proteice, constituind retele multimoleculare stabile. Acesti agenti produc denaturarea proteinelor si modifica functiile celor cu activitate biologica (toxine, enzime). Astfel, exotoxinele tratate cu formaldehida, îsi pierd proprietatile toxice, dar ramân imunogene. Formaldehida si glutaraldehida se folosesc pentru conservarea antigenelor cu greutate moleculara mica (peptide), dar sunt mai putin utilizate pentru conservarea proprietatilor antigenice ale moleculelor mari. Agentii chimici de legare încrucisata modifica imunogenitatea moleculelor proteice prin schimbarea conformatiei moleculei si mascarea epitopilor sau prin modificarea chimica a aminoacizilor epitopului.

Denaturarea semnifica deplierea structurii rasucite a moleculelor

proteice si are loc prin modificarea pH, prin încalzire, prin reducerea legaturilor S-S sub actiunea ureii si a beta-mercaptoetanolului sau a acidului performic. Prin denaturare, proteina îsi pierde nu numai functia biologica, dar îsi modifica specificitatea antigenica. De exemplu, cele 4 punti S-S ale RN-azei, între resturile de cistina, sunt reduse de β-mercaptoetanol si transformate în 8 resturi de cisteina, cu pierderea totala a activitatii enzimatice. Anticorpii fata de RN-aza pancreatica bovina nativa nu precipita moleculele de RN-aza denaturata prin reducerea legaturilor S-S. Invers, anticorpii fata de RN-aza denaturata, nu precipita RN-aza nativa. Modificarea specificitatii anticorpilor sugereaza ca reducerea legaturilor S-S determina pierderea epitopilor conformationali.

Proteinele denaturate reverseaza greu la forma nativa, chiar prin restabilirea conditiilor de mediu.

Hidroliza enzimatica modifica configuratia spatiala a moleculelor proteice native si diminua imunogenitatea lor, cu atât mai mult cu cât fragmentele rezultate au dimensiuni mai mici. Prin clivare enzimatica se anuleaza imunogenitatea epitopilor conformationali si se releva epitopi care în molecula nativa au statutul de epitopi criptici.

O atentie speciala s-a acordat studiului imunogenitatii unor proteine ale caror proprietati biologic-active sunt usor de evaluat: enzime, inhibitori enzimatici, hormoni proteici, toxine, imunoglobuline (în calitatea lor de antigene), proteine ale capsidei sau ale învelisului viral.

Enzimele sunt antigenice, indiferent de originea lor. Reactia moleculelor de enzima cu anticorpii specifici a constituit o modalitate de determinare a pozitiei epitopilor. Anticorpii fata de diferiti epitopi ai moleculei de enzima modifica în grade foarte diferite activitatea ei catalitica. Daca anticorpii sunt specifici fata de epitopi localizati la nivelul situsului activ al enzimei, molecula îsi pierde activitatea fata de substrat, deoarece legarea anticorpilor la situsul activ inhiba competitiv legarea moleculelor de substrat. Gradul de inhibitie a activitatii enzimatice este cu atât mai accentuat, cu cât molecula este mai mare. Efectul inhibitor al anticorpilor nu se produce daca enzima a legat deja substratul specific. Daca gruparile determinante de specificitate ale moleculei de enzima sunt situate în afara situsului catalitic, activitatea enzimei este partial inhibata, datorita modificarilor conformationale care survin dupa reactia antigen-anticorp, sau ramâne intacta. Foarte rar, complexul enzima-anticorp are un efect catalitic superior, comparativ cu enzima nativa.

Hormonii sunt molecule slab imunogene, datorita uniformitatii relative a structurii lor chimice în regnul animal. Anticorpii specifici fata de majoritatea hormonilor proteici se obtin prin asocierea lor prealabila

cu adjuvantul Freund. Imunogenitatea hormonilor este într-o relatie directa cu gradul deosebirilor chimice existente între hormonul exogen si hormonul produs de organismul receptor. Consecinta este sinteza anticorpilor antihormon.

Proprietatile antigenice ale insulinei sunt bine cunoscute, datorita utilizarii clinice a hormonului. Molecula de insulina este alcatuita din doua catene polipeptidice, cu un numar total de 51 de aminoacizi: 21 ai catenei A si 30 ai catenei B. Cele doua catene sunt reunite prin punti S-S. Structura moleculelor de insulina de la diferite specii este foarte asemanatoare, 47 din cei 51 de aminoacizi fiind identici. Deosebirile se gasesc în catena A pentru aminoacizii 8, 9 si 10 (la bovine Ala, Ser, Val, la om sunt Thr, Ser, Ile, iar la ovine Ala, Gly, Val). In catena B, diferenta este limitata la aminoacidul C-terminal. Aceste mici diferente ale secventei de aminoacizi nu modifica functia hormonului. De aceea, insulina, indiferent de provenienta, este la fel de eficienta pentru tratamentul diabetului uman. Micile diferente de secventa, în general, nu sunt sesizate de organismul receptor. Totusi, dupa administrare prelungita, organismele receptoare cu reactivitate imunitara mai înalta, sintetizeaza anticorpi anti-insulina.

Polizaharidele, desi au complexitate structurala relativ mare, conditionata de multitudinea posibilitatilor de legare a atomilor de carbon, sunt molecule slab imunogene în stare nativa, comparativ cu proteinele. Antigenitatea lor este conferita de succesiunea unitatilor componente, de configuratia spatiala a moleculei si de greutatea moleculara. Cele cu greutati mai mici de 50 kD nu sunt imunogene. Polizaharidele sunt antigene cu epitopi secventiali repetitivi si cel putin uneori, în functie de originea polizaharidului si de specia imunizata, sunt imunogeni.

Din punctul de vedere al structurii moleculare, se disting doua tipuri de polizaharide: a) cele care au o catena centrala pe care se insera ramificatiile laterale; b) polizaharide lipsite de o catena centrala, iar ramificatiile sunt dispuse aleatoriu, fara nici o simetrie. Rolul catenelor centrale în conferirea imunogenitatii este controversat, dar ramificatiile laterale au o importanta deosebita pentru determinarea specificitatii antigenice a polizaharidelor. Din punctul de vedere al compozitiei chimice pot fi *homo*- sau *heteroplizaharide*, iar în ceea ce priveste sarcina, pot fi neutre sau încarcate. Oligo- si polizaharidele pot dobândi o structura tertiara (globulara). Uneori, configuratia spatiala a polimerului glucidic este determinanta pentru specificitatea sa antigenica. Schimbarile conformationale ale polizaharidelor se produc mai usor decât ale proteinelor, pentru ca au bariere energetice scazute. Pentru polizaharide, denaturarea este practic necunoscuta, ceea ce le

confera stabilitate. Daca imunogenitatea polizaharidelor native este slaba, adeseori ele se comporta ca haptene, adica devin antigenice dupa cuplarea cu un purtator proteic, rezultând *lectine*, cu o foarte larga distributie în lumea vie. In calitate de haptene, polizaharidele au proprietatea de specificitate, adica se combina cu anticorpii complementari fata de complexul glicoproteic.

Din motive de ordin practic, cele mai studiate polizaharide din punct de vedere antigenic sunt cele de origine bacteriana: dextranul si polizaharidele capsulare.

Dextranii sunt polimeri ramificati de glucoza, resturile glucozil fiind unite mai ales prin legaturi de tip α 1-6, dar în functie de specia producatoare, punctele de ramificatie ale catenelor polimere pot fi 1-2, 1-3 sau 1-4.

Dextranii sunt sintetizati în special de unele bacterii lactice, din zaharoza, dupa reactia:

$$N(\text{zaharoza}) \xrightarrow{\text{Dextranaza}} (\text{Glucoza})n + (\text{Fructoza})n$$

Dextranii au greutati moleculare foarte diferite (pâna la 10^6 D), în functie de gradul de polimerizare. Nu sunt imunogeni si de aceea se folosesc ca înlocuitori ai plasmei. Prin transfuzii repetate cu solutii de dextran la om si prin injectare repetata la soarece, s-au sintetizat anticorpi antidextran. Specificitatea anticorpilor antidextran este foarte înalta. In serul animalelor imunizate cu dextrani s-au detectat doua tipuri de anticorpi: unii specifici fata de resturile de glucozil legate 1-2 si altii specifici fata de resturile de glucozil legate 1-3, ce nu dau reactii încrucisate, desi deosebirea dintre cele doua categorii de molecule de dextran consta numai în modul diferit de legare a resturilor de glucozil între ele.

Polizaharidele capsulare se pot gasi fie sub forma moleculelor libere (“solubile”), fie sub forma corpusculara (atasate celulelor bacteriene capsulate).

Variatiile biochimice ale polizaharidelor capsulare, determinate de compozitia glucidica a catenei, de secventa monomerilor sau de modul de legare a lor în catena, confera tulpinilor bacteriene, specificitate antigenica de tip. La *Str. pneumoniae* s-au identificat peste 80 de tipuri antigenice ale polizaharidelor capsulare. In compozitia lor intra hexoze, pentoze, derivatii lor aminati, metilati etc. Specificitatea antigenica a polizaharidelor capsulare depinde atât de compozitia chimica, cât si de succesiunea monomerilor în catena polizaharidica. Ca vaccinuri, polizaharidele induc starea de toleranta.

Acizii nucleici în stare purificata sunt molecule neimunogene,

datorita uniformitatii lor structurale în lumea vie. Injectarea lor la animale nu induce sinteza anticorpilor. Acizii nucleici nativi sunt *conjugate nucleoproteice*, în care acizii nucleici au rolul de haptena. Majoritatea epitopilor conjugatului sunt conformationali. O fractie din anticorpii anti-conjugat se combina cu acizii nucleici. Anticorpii anti-acizi nucleici se combina cu acizii nucleici în stare pura, indiferent de provenienta. Proteinele asociate acizilor nucleici confera o noua specificitate antigenica si determina sinteza anticorpilor care se combina cu proteina putator.

Experimental, anticorpii anti-acizi nucleici se obtin pe una din urmatoarele cai:

1. *Imunizarea cu bacteriofagi* din seria T par (T_2, T_4, T_6), supusi socului osmotic. ADN al acestor fagi se deosebeste de ADN din celulele eucariote, prin prezenta *5-hidroxi-metilcitozinei glicozilate*, în locul citozinei. Anticorpii au specificitate fata de bazele glicozilate, ceea ce explica lipsa reactiilor încrucisate cu alti acizi nucleici.

2. *Imunizarea cu ribosomi* din celulele vegetale sau animale. Anticorpii sintetizati reactioneaza cu ARN de origine bacteriana, vegetala sau animala, precum si cu polinucleotidele sintetice(poli-A, poli-C, poli-U), dar nu reactioneaza cu ADN nativ si nici cu ADN denaturat.

3. *Imunizarea cu conjugate haptena-proteina* , în care haptena este reprezentata de baze azotate, ribonucleozide, dezoxiribonucleozide, nucleotide, dinucleotide si trinucleotide. Anticorpii sintetizati reactioneaza atât cu haptena cât si cu ADN nativ sau denaturat.

4. Imunizarea cu complexe formate din *acizi nucleici si albumina metilata*. Cele doua molecule formeaza un complex necovalent, datorita interactiei dintre gruparile negative ale acizilor nucleici si cele pozitive ale proteinei. Anticorpii sintetizati reactioneaza cu complexul molecular, cu proteina, cu acidul nucleic nativ si denaturat de diferite origini.

5. Anticorpii anti-acizi nucleici se gasesc în sângele pacientilor cu lupus eritematos diseminat (LED).

Anticorpii sintetizati fata de acizii nucleici cu rol de haptene în conjugatele cu proteine nu au specificitate, deoarece precipita ADN monocatenar, ARN de diferite origini, poliribonucleotide si acizii nucleici dublu catenari.

Lipidele sunt molecule neimunogene în stare nativa, dar se pot cupla cu proteinele si în conjugatul format au rolul de *haptene*. Din punct de vedere imunologic, cele mai importante lipide sunt fosfatidele (sfingomielina si cefalina) si glicosfingolipidele(galactocerebrozida).

O haptena lipidica cu o importanta practica deosebita este *cardiolipina*, din cordul mamiferelor. In sângele indivizilor infectati cu *T. pallidum* se gasesc anticorpi care reactioneaza cu cardiolipina înalt

purificata (reactie încrucisata), extrasa din cordul bovin.

Un alt antigen lipidic este *antigenul Forssman*, inductor al sintezei anticorpilor hemaglutinanti si în prezenta complementului, hemolitici.

Studiul imunogenitatii lipidelor a fost îngreunat de insolubilitatea lor în apa. Problema reactivitatii anticorpilor cu antigenele lipidice a fost depasita partial, prin utilizarea lipidelor auxiliare (lecitina si colesterolul) în suspensia antigenica. Disponibilitatea liposomilor a permis studiul imunogenitatii lipidelor asociate cu membranele.

Haptene

Haptenele(*haptein*, grec = a apuca) sunt substante chimice naturale sau de sinteza, cu molecula mica, a caror imunogenitate este conditionata de cuplarea cu o molecula purtator, dar îsi pastreaza proprietatea de *specificitate*, adica reactioneaza cu anticorpii specifici a caror sinteza a fost indusa de haptena conjugata cu o molecula cu rol de purtator.

Denumirea de “haptena” a fost introdusa de Landsteiner pentru a caracteriza din punct de vedere functional un extract alcoolic de rinichi de cal, neimunogen ca atare pentru iepure, dar capabil sa se combine cu anticorpii sintetizati dupa imunizarea iepurelui cu extractul alcoolic de rinichi de cal, cuplat cu o molecula purtator. El a propus ca în categoria haptenelor sa fie cuprinsa orice substanta naturala sau sintetica, cu greutate moleculara mica sau mare, care în forma nativa nu poate sa induca un raspuns imun detectabil, dar dobândeste capacitatea imunogena, dupa cuplarea sa *in vivo* sau *in vitro*, cu o molecula purtator cu greutate moleculara mare. Conjugatul este imunogen nu numai în raport cu epitopii moleculei purtator, ci si cu epitopul haptenei.

Din punct de vedere functional, haptenele s-au numit “jumatati de antigene”, deoarece au numai una din cele doua proprietati esentiale ale antigenelor: nu sunt imunogene, dar îsi pastreaza proprietatea de specificitate. De aceea, termenul “antigenic” nu este sinonim cu cel de “imunogenic”. Haptena este un antigen, dar în forma sa nativa, nu este imunogena.

În general, haptenele sunt molecule mici, desi uneori, macromoleculele pot functiona ca haptene. Extractul alcoolic de rinichi de cal este o haptena complexa. Haptenele simple sunt reprezentate de polinucleotide, alcooli, formaldehida, unele medicamente etc.

Utilizând haptenele simple, prin reactii de cuplare cu o molecula purtator s-au obtinut *antigene artificiale*. Haptena din complexul molecular are rolul gruparii determinante de specificitate. Studiul

imunogenitatii conjugatelor haptena-molecula purtator a permis determinarea marimii gruparilor determinante de specificitate ale antigenelor si indirect, determinarea situsului de combinare a anticorpilor. Pe aceiasi cale s-a evaluat specificitatea, afinitatea si heterogenitatea anticorpilor. Haptenele au fost folosite pentru studiile de cristalografie cu raze X a unui complex antigen-anticorp.

Haptene autocuplante sunt molecule cu greutate moleculara mica, a caror particularitate consta în aceea ca, dupa injectare, în organism se combina spontan cu proteinele tisulare si formeaza conjugate haptena-proteina, *in vivo*. Conjugatele haptena-proteina induc sinteza anticorpilor si determina procese de hipersensibilitate sau initiaza maladii autoimune. Astfel se comporta derivatii dinitrofenolului substituiti cu clor sau fluor, unii produsi de degradare a penicilinei.

Antigenele corpusculare

Antigenele corpusculare sunt, în esenta, antigene moleculare asociate virusurilor si celulelor. Proteinele capsidale si glicoproteinele învelisului viral sau proteinele prezentate pe suprafata celulelor infectate cu virusuri, sunt foarte imunogene si stimuleaza raspunsul imun al gazdei. De aceea, imunitatea consecutiva infectiei virale este, de obicei, de lunga durata.

Antigenele bacteriene sunt fie *solubile* (eliminate în mediul extracelular), fie *corpusculare* (legate de celula). Din prima categorie fac parte exotoxinele si polizaharidele capsulare libere, iar din cea de a II-a, antigenul somatic O (endotoxina bacteriilor Gram negative), antigenele polizaharidice din glicocalix, flagelina, pilina, acizii teichoici, mureina etc.

Antigenele eritrocitare sunt glicoproteine ale suprafetei eritrocitare, cu determinism biochimic cunoscut, în sistemul A, B, 0. Glicoproteinele eritrocitare de grup sanguin se gasesc si pe suprafata celulelor tisulare, dar si în secretiile exocrine (saliva, suc gastric etc.), la circa 75% dintre indivizi, denumiti “secretori”. Glicoproteinele din secretii sunt hidrosolubile si studiul lor a fost mai usor decât al moleculelor eritrocitare.

Gruparile glucidice ale glicoproteinelor membranei eritrocitare au rol dominant în determinarea specificitatii de grup sanguin, asa cum au evidentiat studiile de digestie enzimatica controlata. Eritrocitele tuturor grupelor sanguine au un precursor antigenic comun – *antigenul H* (codificat de gena H), bine exprimat pe suprafata antigenelor de grup 0 si în cantitati progresiv descrescânde pe hematiile de grup A, B si AB.

Specificitatea antigenica de grup 0 este conferita de *L-fucoza*. Grupul A are o gena ce codifica sinteza glicozil-transferazei, enzima ce adauga N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminala a moleculei

H. De aceea, specificitatea antigenica a eritrocitelor de grup A este conferita de trizaharidul *N-acetil-galactozamina, galactoza si L-fucoza*:

N-acetil galactozamina (α 1-3) Gal – R (R = restul catenei polizaharidice)

α 1-2

Fuc

Indivizii de grup B au o gena ce adauga D-galactoza (în loc de N-acetil galactozamina) la galactoza preterminala a moleculei H, având un determinant antigenic format din doua resturi terminale de *D-galactoza si L-fucoza*.

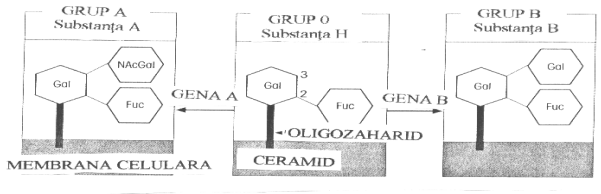


Fig. 3. *Oligozaharidele* cu rol de epitopi determinanti ai grupelor sanguine ABO. Oligozaharidul este ancorat în membrana eritrocitului prin intermediul sfingomielinei, denumita ceramida. 85% din indivizii umani secreta substantele de grup sanguin în saliva. La indivizii "secretori", oligozaharidele sunt prezente sub forma conjugatelor cu polipeptidele codificate de genele secretoare (dupa Roitt, 1997).

Prezenta restului de fucoza (adica antigenul H) este esentiala pentru expresia epitopilor A si B. Gena H si antigenul sau lipsesc la fenotipul Bombay. De aceea, transferazele A si B nu pot adauga glucidele specifice la restul *Gal* al polizaharidului si antigenele de grup A si B nu sunt exprimate.

Exprimarea antigenelor ABO pe hematii poate fi modificata prin tratamentul *in vitro* cu glicozidaze: o α-glicozidaza (extrasa din bobul de cafea verde) poate cliva restul de *Gal* de pe hematiile de grup B si le converteste în hematii de grup 0, ce pot ramâne functionale dupa transfuzia la subiectii de grup 0.

Antigenele de histocompatibilitate (descrise de J. Dausset, 1958) sunt molecule de suprafata ale majoritatii tesuturilor. Din punct de vedere biochimic, ele sunt strict specifice fiecarui organism uman si animal si confera individualitate biochimica proprie fiecarui organism. Se numesc si *antigene de transplantare*, deoarece, dupa grefarea unui tesut sau a unui organ, moleculele de histocompatibilitate se comporta

ca antigene si declanseaza raspunsul imun al organismului receptor, care determina respingerea grefei.

Antigenele individuale de histocompatibilitate se evidentiaza prin reactia de respingere a grefei. În functie de raportul genetic dintre donor si receptor, antigenele de histocompatibilitate apartin urmatoarelor categorii:

1) *autoantigenele* includ antigenele proprii de histocompatibilitate, care, în conditii normale sunt tolerate de sistemul imunitar. Sub actiunea unor factori fizici, chimici sau biologici, antigenele de histocompatibilitate se modifica devenind autoantigene, generatoare ale conflictelor autoimune;

2) *izoantigenele* cuprind antigenele de transplantare comune orga-nismelor identice din punct de vedere genetic, care apartin unei linii genetic pure (inbred). Verificarea puritatii genetice a unei populatii de organisme se face prin transplantul de piele. Daca grefa este acceptata, organismele respective apartin aceleiasi linii inbred. Termenii “izoantigen” si “inbred” nu au corespondenta pentru populatia umana;

3) *aloantigenele* (*alos* = altul) includ molecule care, dupa injectare declanseaza raspunsul imun la organisme ale aceleiasi specii, dar diferite genetic, de organismul donor. Aloantigenele sunt inegal raspândite la indivizii unei specii si induc raspunsul imun la organismele care nu poseda antigenul respectiv. Aloantigenele se evidentiaza dupa imunizarea unui organism, cu o suspensie celulara provenita de la organisme ale aceleiasi specii, dar apartinând unui alotip diferit;

4) *heteroantigenele* (xenoantigene, *xenos* = strain) includ molecule care se gasesc în/pe celulele tuturor indivizilor unei specii si care se comporta ca antigene fata de organismele altei specii. Heteroantigenele se evidentiaza prin sinteza anticorpilor fata de antigenele celulelor provenite de la un organism al unei specii diferite.

Celulele unei specii diferite aduc în organismul receptor nu numai heteroantigene, ci si aloantigene si chiar autoantigene. De aceea injectarea unui heteroantigen este una dintre cele mai utilizate metode pentru a induce sinteza autoanticorpilor.

Antigenele de organ sunt molecule specifice care confera particularitatile biochimice si functionale ale celulelor unui organ. De exemplu, proteinele hepatice sau ale glandei mamare difera de proteinele tesutului renal al aceluiasi organism.

Antigene artificiale

La origine, antigenele artificiale sunt *antigene naturale, modificate chimic* prin cuplarea, cel mai adesea covalenta, cu una sau mai multe

specificitate de combinare cu anticorpii, în raport cu molecula de origine.

Antigenele artificiale s-au obtinut, în principal, pornind de la moleculele proteice. Prin legarea moleculelor proteice cu diferite haptene s-au obtinut trei tipuri de antigene artificiale:

a) *conjugate haptena-proteina*, prin reactia de diazotare, iodurare si respectiv substitutie nucleofila;

b) *conjugate proteina-proteina,* prin intermediul unor agenti bifunc-tionali de legare (diizocianatii si carbodiimidele);

c) *proteine legate de suporturi insolubile*, prin reactia de diazotare sau prin intermediul carbodiimidelor.

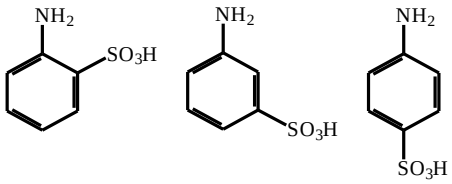
a) *Conjugatele haptena-proteina* au fost utilizate de Landsteiner, în studiile cu privire la mecanismele raspunsului imun. In conjugate, haptenele îndeplinesc rolul de *epitopi* (grupari determinate de specificitate), iar mole-culele proteice au rolul de *carrier*. Raspunsul imun nu este orientat strict fata de epitopii haptenici, ci si fata de determinanti antigenici ai gruparii carrier.

Cuplarea haptena-purtator necesita existenta unei grupari reactive a haptenei, care sa se lege covalent cu gruparile functionale ale purtatorului, cu conditia pastrarii integritatii functionale a celor doi reactanti. Haptenele se pot cupla cu purtatori foarte diversi, dar proteinele naturale (albumina, globulinele) furnizeaza conjugate foarte imunogene.

Landsteiner a cuplat amino-benzen-sulfonatul cu molecule proteice, prin reactia de diazotare si a obtinut azoproteine:

Dupa cuplarea haptenei cu Tir, His sau Lys din structura unei proteine, rezulta un antigen artificial care induce formarea a doua categorii de anticorpi cu specificitati diferite, dupa cum reactioneaza cu haptena, sau cu molecula purtator.

Conjugatele azoproteice au permis studiul influentei configuratiei spatiale a haptenei, asupra specificitatii antigenice. Gruparea sulfonat a fost legata în pozitia *orto, meta* sau *para* a haptenei aminobenzen. Antiserurile obtinute au specificitate fata de fiecare izomer. Izomerul *meta* al aminobenzen-sulfonatului, cuplat cu proteina, pastreaza capacitatea de a precipita cu anticorpii specifici fata de proteina nativa, în timp ce conjugatele cu izomerii *orto*- si *para*- dau reactie foarte slaba de precipitare. Concluzia este ca izomerii de pozitie induc modificari sterice (conformationale) ale haptenei.



Orto Meta Para

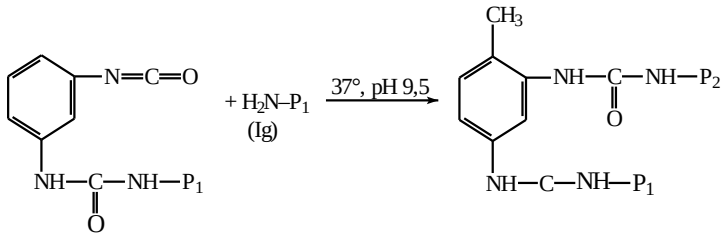
Conjugatele haptena-proteina se pot obtine prin *reactia de iodurare*. Proteinele puternic iodurate îsi modifica specificitatea antigenica. Ele induc sinteza anticorpilor care dau reactii încrucisate de precipitare cu proteinele iodurate heterologe. Semnificatia este ca prin iodurare, proteinele îsi pierd specificitatea antigenica. Toate proteinele iodurate induc sinteza anticorpilor fata de o grupare iodurata, în special fata de tirozina iodurata, indiferent de specificitatea gruparii purtator.

O alta reactie de obtinere a conjugatului haptena-proteina este cea de *substitutie nucleofila*. Cele mai folosite haptene sunt 2,4-dinitrofenolul(DNP) si 2,4,6-trinitrofenolul(TNP).

Mecanismul molecular al cuplarii este urmatorul: un atom de H din gruparea OH^- , NH_2^+ sau S-SH a proteinei, este înlocuit de gruparea haptenica prin eliminarea apei. Proteina pierde electroni, iar nucleul benzenic îi accepta. Gruparile donoare de electroni sunt OH^- , NH_2^+, S-SH. Gruparile DNP si TNP sunt cuplate cu proteina purtator sub forma 2,4-dinitrobenzen-sulfonatului de Na, a 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonatului de Na sau sub forma derivatilor halogenati.

Reactia dintre o proteina si 2,4-dinitrobenzen-sulfonatul de sodiu ilustreaza mecanismul *atacului nucleofilic*, reactie în care proteina cedeaza electroni, iar nucleul benzenic îi accepta.

b) *Conjugatele proteina-proteina* se obtin prin intermediul agentilor bifunctionali de legare: diizocianatii si carbodiimidele. Deoarece gruparile *ciano* au reactivitate diferita, reactia de cuplare se realizeaza în trepte. De exemplu, gruparea din pozitia 4 a toluilen-diizocianatului este mai reactiva decât gruparea *ciano* din pozitia 2. Aceasta permite ca una dintre proteine sa se cupleze în pozitia 4, iar ulterior, într-o noua etapa a reactiei, cea de a II-a proteina se va cupla la gruparea *ciano* din pozitia 2:



Etapa a II-a a reacţiei de cuplare

Carbodiimidele, utilizate ca agenti bifunctionali pentru cuplarea proteinelor, sunt considerate anhidride simetrice ale ureii:

$H_2N - C - NH_2$ – HOH → HN = C =NH → $H_2N - C \equiv N$

O

Uree Carbodiimida simetrica Cianamida asimetrica

Carbodiimidele pot fi substituite simetric sau asimetric cu molecule proteice:

$$R_1N = C = NR_1 \text{ sau } R_1N = C = NR_2.$$

Agentii bifunctionali de cuplare permit obtinerea conjugatelor proteice (conjugate anticorpi-feritina, insulina-albumina), dar se folosesc si ca mediatori ai legarii diferitelor molecule proteice pe suprafata eritrocitelor.

Marcajul cu feritina este deosebit de important din punct de vedere practic, deoarece se foloseste pentru evidentierea electrono-optica, la nivelul membranei, a diferitelor molecule proteice.

c) *Conjugatele proteina-suport insolubil* se obtin prin cuplarea proteinelor cu un suport insolubil, prin reactia de diazotare, prin intermediul carbodiimidelor sau al BrCN. Ca suporturi insolubile se folosesc derivati celulozici: sephadex, sepharoza, agaroza etc. Legarea proteinei de suport, prin reactia de diazotare, se face prin intermediul tirozinei, lizinei, histidinei, triptofanului sau argininei.

Conjugatele anticorpi-suport insolubil se numesc *imunosorbenti* si sunt folositi cu o eficienta deosebita pentru purificarea proteinelor dintr-un amestec, datorita specificitatii lor de combinare cu anticorpii corespunzatori, fixati într-o coloana de material inert. Antigenul complementar specificitatii de legare a anticorpului fixat în coloana, se

leaga necovalent de imunosorbent, dupa care poate fi eluat cu un agent chimic.

Anticorpii pot fi imobilizati pe un suport insolubil, prin tratamentul cu un agent de legare încrucisata (glutaraldehida), dar multe din situsurile reactive pt fi denaturate sau ramân ascunse.

Conjgat Absorbtia antigenului Spalare Elutie

Fig. 4. Principiul functional al *imunosorbentilor* utilizati în cromatografia de afinitate. Coloana contine sefaroza, pe care sunt fixate moleculele de anticorp. Amestecul de antigene este trecut
prin coloana, unde va fi retinut numai antigenul care recunoaste specific anticorpul fixat.

Cel mai bun suport de imobilizare este agaroza, un polizaharid obtinut prin fractionarea agarului. Agaroza este rezistenta la actiunea degradativa a enzimelor bacteriene si a agentilor chimici si poate fi regenerata. Este disponibila sub forma sferelor poroase hidratate, cu diametrul de 40-300 μm si contine 2-8% agaroza în solutie apoasa.

In coloana de imunosorbent se pot fixa nu numai anticorpii, ci si antigenele sau chiar celule intacte.

Imunosorbentii se folosesc în activitatea de cercetare si în clinica, pentru prepararea unor produse biologice si a medicamentelor.

Antigene sintetice

Antigenele sintetice sunt polimeri de aminoacizi, cu secventa cunoscuta, obtinuti *in vitro*. Proprietatile imunogenice ale homopolimerilor (poli-Lys, poli-Glu, poli-Pro) si ale heteropolimerilor au fost studiate de M. Sela. Studiul imunogenitatii heteropolimerilor are avantajul ca ofera posibilitatea studiului influentei compozitiei chimice, a greutatii moleculare si a conformatiei moleculare, usurând studiul imunochimic al gruparilor determinante de specificitate antigenica.

Catenele polipeptidice sintetice pot fi *lineare* sau *ramificate*. Cele ramificate rezulta prin atasarea polimerilor lineari, la o catena polifunctionala. Ramificarea se obtine mai usor cu aminoacizi *aromatici*.

Homopolimerii nu sunt imunogeni, cu exceptia poli-L-Pro, poli-L-Glu, poli-L-Arg, poli-L-Lys. Copolimerii formati din doi aminoacizi nu sunt totdeauna imunogeni, dar cei rezultati prin polimerizarea a trei aminoacizi diferiti sunt totdeauna imunogeni. Cu cât compozitia lor este mai heterogena, imunogenitatea este mai accentuata. Prezenta

aminoacizilor aromatici confera o anumita rigiditate a epitopilor si implicit, o imunogenitate superioara.

Pentru a fi imunogeni, copolimerii trebuie sa fie catabolizati de aparatul enzimatic al celulelor care prelucreaza si prezinta antigenul. Polipeptidele formate din D-aminoacizi sunt slab imunogene, datorita incapacitatii organismului de a cataboliza polimerul. Polipeptidele sintetice s-au dovedit a fi foarte utile în studiile de imunochimie, cu privire la:

- determinarea marimii gruparii determinante de specificitate si indirect, a situsului de combinare a anticorpilor specifici;
- rolul dimensiunilor moleculei asupra proprietatilor de imunogenitate;
- rolul configuratiei spatiale a moleculei în conferirea proprietatii de imunogenitate;
- identificarea epitopilor secventiali si conformationali.

Determinantii antigenici

De cele mai multe ori, antigenele sunt macromolecule complexe sau chiar celule întregi, dar raspunsul imun, dupa injectarea lor în organism, este orientat predominant fata de situsuri discrete, strict limitate ale antigenului, denumite *grupari determinante de specificitate* (gds), *situsuri antigenice*, *determinanti antigenici* sau *epitopi*.

Epitopul este regiunea limitata a antigenului care induce un raspuns imun specific, se combina cu situsul activ al moleculei de anticorp si determina specificitatea reactiei antigen-anticorp.

Antigenele proteice prezinta cea mai mare diversitate de epitopi, atât în privinta compozitiei chimice, cât si a configuratiei spatiale. Studiile de cristalografie cu raze X permit identificarea atomilor individuali ai unei molecule si determinarea mobilitatii lor, exprimata în *factori de temperatura atomica.* Factorii de temperatura ridicata corespund regiunilor moleculare cu mobilitate înalta (regiuni calde). In molecula proteica, epitopii corespund zonelor moleculare cu o mobilitate înalta a atomilor. La temperatura biologica, aceste secvente necesita cantitati mici de energie, pentru a trece dintr-o conformatie în alta. Invers, regiunile moleculare cu mobilitate atomica redusa au factori termici de valoare scazuta (regiuni reci) si necesita o cantitate mai mare de energie pentru schimbarea conformatiei. Adeseori, epitopii antigenici sunt localizati în regiunile calde ale moleculei.

Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a functiona ca epitop (adica de a stimula raspunsul imun) se numeste *imunopotenta*.

Marimea gruparii determinante de specificitate s-a apreciat indirect prin determinarea marimii haptenei capabila sa “umpla” complet situsul de combinare al anticorpului. În acest scop s-a utilizat *sistemul dextran-antidextran*, într-o reactie de precipitare. Dextranul cu greutate moleculara de 50 kD este imunogen si prin injectare repetata la iepure, se obtine serul imun anti-dextran. Artificial se prepara oligozaharide cu dimensiuni controlabile. Reactia de precipitare dextran-anticorpi specifici este inhibata progresiv de oligozaharidul de glucoza si este completa în prezenta hexazaharidului. *Oligomerul cu 6 resturi de glucoza* corespunde celui mai bun *ligand* care se cupleaza cu anticorpii anti-dextran (ligandul este orice molecula capabila sa formeze un complex cu o alta molecula). Heptazaharidul, ca si oligozaharidele cu mai putin de 6 resturi de glucoza inhiba mai putin eficient reactia de precipitare a sistemului dextran-antidextran.

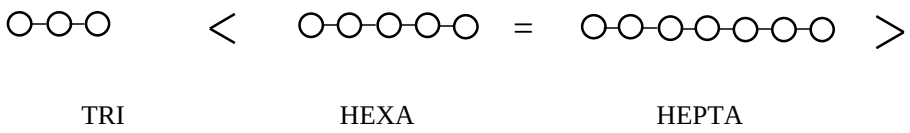


Fig. 5. Oligozaharidul format din 6-7 resturi de glucoza, blocheza cu cea mai mare eficienta, reactia de precipitare dintre dextran si anticorpii specifici antidextran. Oligozaharidele mai mari sau mici nu se combina eficient cu anticorpii si inhiba într-o masura progresiv mai mica reactia de precipitare cu dextranul.

Cercetari similare s-au facut cu homopolimeri de aminoacizi (poli-Lys, poli-Ala), legati de proteine purtator. Serul imun obtinut pe iepure, fata de aceste conjugate, contine predominant anticorpi specifici fata de haptena homopolimerica. Reactia de precipitare dintre serul specific si conjugatul haptena-proteina, este inhibata de *pentamerul de alanina*, ceea ce denota ca acesta se leaga cu cea mai mare afinitate de situsul de combinare al anticorpului. Pentamerul corespunde marimii epitopului antigenic al conjugatului si reflecta, indirect, marimea situsului de combinare al anticorpilor specifici.

În concluzie, marimea unui epitop polizaharidic corespunde la 6-8 unitati monomerice, iar pentru antigenele proteice, epitopul are 4-6 aminoacizi.

Valenta antigenului s-a definit conventional prin numarul de epitopi ai unui antigen. Numarul de epitopi ai unei molecule antigenice variaza în raport cu marimea si complexitatea sa structurala.

Valenta se evalueaza prin numarul moleculelor de anticorp care reactioneaza cu o molecula de antigen. Pentru evaluarea numarului de epitopi ai unui antigen, trebuie avut în vedere ca molecula de anticorp

este bivalenta (leaga doi epitopi), dar si faptul ca un antiser nu contine anticorpi fata de toti epitopii unui antigen.

Studiile privind reactia antigen-anticorp *in vitro*, au condus la concluzia existentei a trei tipuri de valente antigenice (epitopi):

– *valentele functionale conformationale* sunt conferite de epitopii conformationali, situati la suprafata moleculei native de antigen si sunt accesibili sistemelor imunitare de recunoastere specifica a moleculei. Numarul lor este proportional cu greutatea moleculara a antigenului si este dependent de complexitatea conformationala a moleculei. Un situs antigenic, teoretic, s-ar gasi la fiecare câteva mii de daltoni;

– *valentele functionale interne* sunt reprezentate de epitopi interni, care, în molecula nativa sunt inaccesibile sistemului imunitar. Ele devin functionale, *in vivo*, dupa degradarea partiala a moleculei, în celulele care prelucreaza antigenul;

– *valente nefunctionale*, reprezentate de epitopi criptici care nu devin functionale dupa prelucrarea antigenului *in vivo*, dar se pot releva dupa clivarea enzimatica *in vitro* a moleculei.

Numarul total al epitopilor unui antigen nu se cunoaste, dar se poate evalua cu aproximatie, dupa degradarea partiala a moleculei de antigen. De exemplu, albumina serica bovina nativa are 6 situsuri functionale conformationale. Dupa scindarea enzimatica menajata *in vitro*, rezulta 9 fragmente peptidice, fiecare dintre ele dând reactie de precipitare cu serul anti-albumina nativa. Pentru ca reactia de precipitare sa aiba loc, sunt necesari cel putin doi epitopi, ceea ce înseamna ca molecula de albumina serica bovina are cel putin 18 epitopi, care devin functionali dupa scindarea enzimatica a moleculei si induc sinteza anticorpilor specifici.

Efectul de carrier

Antigenele prezinta o dualitate functionala evidenta, conferita de faptul ca specificitatea raspunsului imun este orientata predominant, dar nu exclusiv, fata de gruparile determinante de specificitate. La rândul sau, suportul macromolecular (carrier) are proprietatea de imunogenitate, dar confera si un grad de specificitate a raspunsului imun. Rezultatele experimentale cu *conju-gate haptena-proteina* (dinitrofenol-albumina serica) au evidentiat ca în cazul în care suportul carrier este nonself, raspunsul imun este mai intens. Antigenul artificial s-a obtinut prin cuplarea DNP cu albumina de soarece. Injectarea conjugatului la soarece induce un raspuns imun slab, cu un titru scazut al anticorpilor anti-DNP(anti-haptena). Conjugatul DNP-albumina serica bovina, injectat la soarece, stimuleaza intens raspunsul imun primar

anti-haptena, ceea ce demonstreaza ca gruparea carrier are rol modulator asupra raspunsului imun.

Rolul gruparii carrier în reactivitatea imunitara a fost evidentiat prin evaluarea titrului anticorpilor dupa stimularea secundara. Animalele stimulate repetat cu haptena A, cuplata cu purtatorul B, produc un raspuns imun secundar intens, cu anticorpi anti-haptena si anti-carrier. Însa, în raspunsul imun secundar, daca stimularea s-a facut cu haptena A, cuplata cu un carrier diferit (C) titrul anticorpilor anti-haptena nu creste. Acest fenomen curios s-a denumit “efect de carrier”.

Un purtator eficient pentru stimularea raspunsului imun trebuie sa fie imunogenic, adica sa stimuleze raspunsul celulelor T. Moleculele neimunogene sunt purtatori ineficienti ai haptenelor, pentru stimularea raspunsului imun. Aceasta arata ca mecanismele de recunoastere pentru haptena si pentru gruparea purtator sunt diferite.

Imunizarea cu conjugate haptena-carrier, a indus numai sinteza anticorpilor specifici anti-haptena, daca purtatorul a fost un antigen T-dependent. Moleculele neimunogene nu au calitati de carrier pentru haptene.

“Efectul de carrier” denota ca haptena si epitopii purtatorului sunt recunoscuti separat, de limfocitele B si respectiv T. Cele doua subpopulatii de celule coopereaza pentru a induce sinteza anticorpilor cu specificitate de haptena.

FACTORII CARE CONDITIONEAZA IMUNOGENITATEA

Antigenul este o substanta nonself, care, la contactul cu celulele sistemului imunitar, declanseaza sinteza anticorpilor specifici si a receptorilor celulari cu care se combina *in vitro* si *in vivo*. Definitia este nesatisfacatoare, pentru ca se refera la *ce face* antigenul, fara sa-l defineasca în termeni proprii. Definirea completa a antigenului este rezultatul însumarii unei serii de proprietati, fiecare dintre ele fiind o conditie necesara a imunogenitatii, dar nu si suficienta.

Conditiile imunogenitatii au fost deduse prin studii experimentale, utilizând *antigene artificiale* si *sintetice*.

1. *Caracterul strain al moleculei* este conditia majora a imunogenitatii. O molecula nonself este cu atât mai imunogena, cu cât este mai diferita de moleculele organismului receptor. In esenta, caracterul nonself al unei molecule nu este strict dependent de raporturile taxonomice ale organismului donor cu cel receptor de

antigen, ci este consecinta deosebirilor de structura moleculara.

Cele mai multe proteine ale unei specii sunt nonself pentru alte specii, dar uneori, proteinele omologe ale unor specii sunt lipsite reciproc de imunogenitate. De exemplu, hemoglobina de cal nu este imunogena pentru iepure, desi celelalte proteine de cal sunt imunogene. Caracterul nonself nu implica în mod obligatoriu existenta unor molecule cu totul noi, neîntâlnite la organismul receptor, ci numai modificari minime ale moleculei, conferite de existenta câtorva aminoacizi diferiti în anumite pozitii ale catenei proteice. Pentru restul secventei, molecula nonself poate fi asemanatoare proteinelor proprii organismului receptor de antigen. Micile diferente de secventa a aminoacizilor, au rolul de epitopi. De regula, proteinele aparute timpuriu în evolutie au un grad superior de asemanare chimica interspecifica si sunt slab imunogene pentru speciile înrudite (de exemplu, albumina serica), iar cele aparute mai târziu (de exemplu, globulinele serice) sunt mai heterogene si mai imunogene.

2. *Marimea moleculei* influenteaza imunogenitatea moleculelor nonself. Pentru a fi imunogena, o molecula trebuie sa aiba dimensiuni care sa depaseasca un prag limita. Moleculele cu o buna imunogenitate sunt mai mari de 10 kD. Cu cât o molecula este mai mare, cu atât numarul epitopilor sai este mai mare. Secventele de aminoacizi cu rol de epitopi au sansa repetarii de mai multe ori într-o molecula mai mare. Proteinele mari (de exemplu, ovalbumina – 40 kD, albumina serica - 70 kD, hemocianina – 6000 kD) sunt foarte imunogene, iar cele cu molecula mica (insulina – 5,7 kD, histonele – 6 kd, glucagonul – 3,5 kD) sunt putin imunogene. Glucagonul este cea mai mica molecula naturala fata de care s-au obtinut anticorpi, iar cea mai mica molecula sintetica imunogena este un polipeptid de 1,4 kD.

Pentru polizaharide, limitele minime pentru imunogenitate sunt mai mari. Dextranii sunt antigenici daca au peste 50 kD, cu variatii mari de raspuns imun de la o specie la alta (omul si soarecele raspund bine, cobaiul – foarte putin).

Moleculele mici neimunogene sau slab imunogene pot dobândi o imunogenitate optima, dupa adsorbtia pe particule inerte de colodiu, caolin sau de carbune. Acestea au rol de purtatori si asigura cresterea taliei moleculare.

3. *Complexitatea moleculara*. Dimensiunile mari ale unei molecule nonself nu sunt totdeauna suficiente pentru a-i conferi imunogenitate. De exemplu, moleculele de polimeri sintetici (poli-acrilamida, nylonul) sunt foarte mari, fiind formate dintr-un numar mare de monomeri repetitivi, dar nu sunt imunogene pentru ca nu au complexitatea moleculara minima necesara.

Moleculele naturale, în special proteinele au un grad înalt de complexitate, datorita diversitatii monomerilor componenti. Fiecare tip de molecula proteica are o configuratie tridimensionala unica, determinata de secventa specifica de aminoacizi.

Proteinele globulare au cea mai mare complexitate antigenica, derivata din configuratia lor tertiara. Ele poseda *epitopi exprimati pe suprafata moleculei native*, accesibili fenomenului de recunoastere de catre celulele sistemului imunitar si *epitopi interni*, care pot stimula raspunsul imun, dupa clivarea enzimatica a moleculei în celulele specializate pentru prelucrarea antigenelor. De exemplu, serul imun anti- albumina serica bovina precipita cu fiecare din cele 9 fragmente peptidice rezultate prin clivajul enzimatic al moleculei native, ceea ce sugereaza ca *in vivo*, molecula este scindata si astfel se releva epitopi interni, fata de care se sintetizeaza anticorpi specifici.

Complexitatea unei molecule nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci si de secventa lor si de efectul secventei asupra structurii secundare, tertiare si eventual quaternare a moleculei.

4. *Starea fizica a antigenului*. Imunogenitatea unei molecule este conditionata de o anumita rigiditate a epitopilor sai. Lipsa rigiditatii ar explica imunogenitatea redusa a gelatinei, o proteina denaturata, derivata din hidroliza colagenului, foarte bogata în glicocol (21-35%).

În mod obisnuit, rotatia libera a unei molecule are loc numai între C α si legatura peptidica. Glicocolul nu realizeaza ramificatii ale catenei polipeptidice în pozitia C α, ceea ce face ca molecula de gelatina sa prezinte rotatii libere în jurul axului longitudinal. Gelatina are o proportie foarte mica de aminoacizi aromatici (Tir, His), iar cisteina si triptofanul lipsesc. Legarea L-Tir, în proportie de 2% mareste gradul de imunogenitate a gelatinei. Complexul induce sinteza anticorpilor care precipita gelatina nativa.

5. *Solubilitatea*. Conditia solubilitatii unui antigen pentru a fi imunogen este sugerata de urmatarele observatii:

– polimerii macromoleculari sintetici care nu sunt solubilizati, adica nu sunt hidrolizati, sunt lipsiti de imunogenitate;

– organismele cu echipamente enzimatice hidrolitice mai active (soarece) elaboreaza un raspuns imun mai amplu fata de un antigen greu solubil(de exemplu, polizaharidul de pneumococ), în raport cu organismele care hidrolizeaza mai greu (de exemplu, iepurele);

– antigenele corpusculare (celule, virioni) devin imunogene dupa solubilizarea si eliberarea componentelor imunogene în macrofag, unde are loc degradarea menajata a antigenelor.

Hidroliza enzimatica a antigenului nu este totdeauna o conditie prealabila obligatorie a imunogenitatii. Studiile cu antigene sintetice au aratat ca, în momentul recunoasterii de catre celulele sistemului

imunitar, o parte a epitopilor sunt intacti, identici cu aceia ai moleculei native.

6. *Accesibilitatea determinantilor antigenici*. Pentru ca un epitop sa fie imunogen, trebuie sa fie expus la suprafata moleculei, pentru a fi accesibil mecanismelor de recunoastere imunitara. De exemplu, un polimer de L-Lys, cu rol de purtator pentru tripeptidul Tir-Ala-Glu este imunogen. Dupa mascarea epitopilor tripeptidici cu catene de poli-Ala, molecula îsi pierde imunogenitatea.

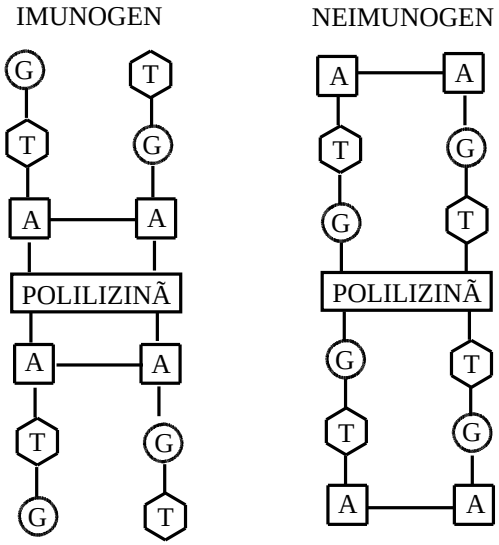


Fig. 6. Rolul accesibilitatii *determinantilor antigenici* în imunogenitate. Copolimerul multicatenar format din acidul L-glutamic (G) si tirozina (T), legat prin intermediul poli L-alaninei (A-A), de purtatorul polilizina este imunogen. Acelasi copolimer, legat direct de purtatorul polilizina, dar mascat de polialanina, este neimunogen.

7. *Configuratia spatiala a moleculei* este un factor decisiv pentru imunogeneza. Studiile privind imunogenitatea antigenelor sintetice, au evidentiat ca cel mai adesea, anticorpii se formeaza fata de o anumita secventa de aminoacizi, care are rol de epitop. Dar, uneori, anticorpii sunt specifici fata de *configuratia spatiala* a unui determinant antigenic. Concluzia a reiesit din specificitatea distincta a anticorpilor fata de doua polipeptide sintetice cu aceiasi compozitie chimica, dar cu configuratii spatiale diferite. In primul caz, determinantul antigenic este tripeptidul Tir-Ala-Glu, legat de un polimer sintetic, cu rol de purtator. La iepure, se sintetizeaza anticorpi specifici fata de tripeptidul Tir-Ala-Glu.

În al II-lea caz, prin polimerizarea tripeptidului se obtine o molecula cu structura periodica a secventei Tir-Ala-Glu, care dobândeste configuratie α-helicala. Dupa imunizarea iepurelui, se

sintetizeaza anticorpi care precipita moleculele cu structura spatiala α-helicala, dar nu precipita tripeptidul simplu. Pe baza acestor observatii, M. Sela recunoaste existenta a doua tipuri de determinanti antigenici:

– *determinanti secventiali*, a caror specificitate este data de secventa subunitatilor componente (aminoacizi, monozaharide), indiferent de structura spatiala a moleculei. Epitopii secventiali sunt comuni pentru toate polipeptidele care au secvente de aminoacizi identice sau asemanatoare si existenta lor este o sursa a reactiilor imune încrucisate;

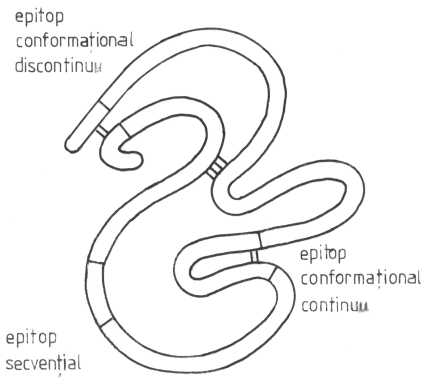


Fig. 7. Tipuri de *epitopi*. Epitopi secventiali si conformationali, continui si discontinui.

– *determinanti antigenici conformationali*, a caror specificitate deriva din configuratia spatiala a moleculei. Epitopii conformationali sunt de doua feluri: *continui* si *discontinui*. Cei discontinui sunt formati din regiuni distincte ale moleculei, care ajung în juxtapozitie când molecula se pliaza în configuratia sa nativa.

Mentinerea integritatii determinantilor conforma-tionali este conditionata de integritatea legaturilor S-S. Dupa fragmentarea enzima-tica a moleculei, epitopii conformationali discontinui îsi pierd integritatea si semnificatia functionala, iar cei continui au o soarta variabila: îsi pierd sau îsi pastreaza configuratia avuta în molecula nativa.

Importanta epitopilor conformationali a fost evi-dentiata pentru molecula de lizozim din albusul de ou de gaina. Bucla formata de aminacizii 64-80 este închisa de o legatura S-S între doua resturi de cisteina. Secventa buclei a fost sintetizata artificial si legata de polimerul

Ala-Lys, cu rol de carrier. Complexul format induce sinteza anticorpilor

la iepure, specifici fata de aceasta secventa, dar dau reactie de precipitare si cu molecula nativa de lizozim.

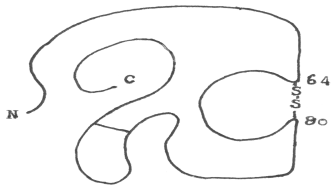


Fig. 8. Bucla formata din aminoacizii 64-80 ai secventei moleculei de lizozim din albusul de ou, formeaza un *determinant conformational*.

În general, anticorpii care se sintetizeaza fata de antigenele proteice naturale au specificitate, în primul rând, fata de epitopii conformationali si mai rar fata de cei secventiali, ceea ce denota ca sistemul imunitar recunoaste molecula nativa sau regiuni ale ei, cu configuratia spatiala initiala.

În concluzie, studiul antigenelor sintetice a avut un rol decisiv pentru definirea conditiilor de imunogenitate. Polizaharidele sunt molecule cu o slaba imunogenitate, corespunzatoare unei complexitati moleculare limitate. Acizii nucleici si lipidele sunt molecule neimunogene în stare nativa, dar dupa cuplarea cu un suport proteic, îndeplinesc rolul de haptene si devin foarte imunogene. Din aceasta cauza, nucleoproteinele si lipoproteinele sunt antigene foarte eficiente. Proteinele native sunt imunogene, dar pentru exprimarea la un nivel superior a acestei proprietati, trebuie sa îndeplineasca conditiile enumerate. Acestea, luate în parte, sunt necesare, dar nu suficiente. O buna imunogenitate este rezultatul cumularii unui numar cât mai mare de conditii.

Un antigen ideal trebuie sa fie greu degradabil (pentru o persistenta cât mai lunga în organism), sa fie timodependent si sa aiba un numar cât mai mare de semnale imunogene (epitopi), conectate într-un ansamblu functional, denumit *imunon.*

Antigene endogene

Antigenele endogene sunt componente celulare si tisulare proprii (self), fata de care, în conditii normale, sistemul imunitar nu manifesta reactivitate. Totusi, unele componente tisulare, în anumite conditii, pot

sa stimuleze reactivitatea imunitara. Se disting doua categorii de antigene endogene: 1) *antigene sechestrate* (mascate) si 2) *antigene alterate*.

Antigenele sechestrate sunt substante cu localizare *intracelulara* si de aceea nu sunt accesibile sistemului imunitar pentru a fi recunoscute în cursul dezvoltarii ontogenetice. Sub actiunea unor factori (fizici, chimici, biologici), inductori ai unor procese de liza celulara, moleculele cu localizare intracelulara se pot elibera si sunt recunoscute ca nonself de sistemul imunitar. De exemplu, anticorpii antimitocondriali care caracterizeaza ciroza biliara primitiva, se sintetizeaza dupa liza unor celule si eliberarea acestor organite.

Alteori, unele componente tisulare sunt separate de sistemul imunitar, prin bariere anatomice:

– *proteinele cristalinului*, delimitate de cristaloida, se elibereaza în cursul interventiilor chirurgicale, dupa traumatisme care sparg capsula sau dupa afectiuni care permeabilizeaza cristaloida. Ele sunt recunoscute ca molecule nonself si stimuleaza raspunsul imun anti-cristalin, ce poate afecta irisul, procesele ciliare si coroida;

– *proteinele spermatice*, în starile de spermostaza, induc sinteza locala a autoanticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii recunosc specific un antigen al spermatozoizilor si rezultatul este imobilizarea sau chiar aglutinarea, cu consecinta sa, sterilitatea imunitara;

– *caseina din lapte* poate stimula reactivitatea autoimunitara.

Antigenele alterate sunt molecule normale ale suprafetei celulare, legate de membrana, care, din diferite cauze(uzura fiziologica sau sub actiunea diferitilor factori – fizici, chimici, biologici) îsi modifica structura chimica si sunt recunoscute ca molecule nonself. De exemplu, unele medicamente, dupa legarea cu diferite molecule din plasma sau de pe suprafata eritrocitelor, le modifica conformatia nativa si acestea sunt recunoscute ca nonself. Virusurile induc sinteza în celula infectata, a antigenelor proprii, dar adeseori moleculele specific virale determina modificarea unor molecule self, care sunt recunoscute ca molecule straine si initiaza conflictul autoimun.

În conditii normale, antigenele sechestrate si alterate sunt neutralizate si eliminate, fara consecinte patologice. În 1900, Ehrlich a formulat conceptul “horror autotoxicus”, care semnifica preponderenta actiunii mecanismelor homeostatice. In conditiile unei reactivitati imunitare crescute, activarea raspunsului imun fata de aceste componente chimice are drept consecinte, declansarea *maladiilor autoimune*, considerate ca fiind expresia patologica a functiei imunitare.

Antigene heterofile

Antigenele heterofile sunt substante neidentice, dar înrudite chimic, prezente la numeroase specii de organisme: om, animale, plante, microorganisme. Particularitatea dominanta consta în faptul ca ele induc sinteza anticorpilor care dau reactii încrucisate: anticorpii specifici fata de un antigen al grupului heterofil, reactioneaza (într-o reactie de precipitare sau de aglutinare) cu oricare dintre antigenele grupului.

Prototipul antigenelor heterofile este *antigenul de tip Forssman*, descoperit în 1911 în tesuturile de cobai. J. Forssman a descoperit ca serul imun obtinut prin imunizarea iepurelui cu omogenat tisular de cobai, aglutineaza eritrocitele de berbec. Este o reactie încrucisata, pe care autorul a denumit-o *reactie heterologa*. Termenul "heterolog" s-a pastrat pentru reactiile încrucisate previzibile, pe care le manifesta diferite antigene înrudite (de exemplu, albumina serica de om si de primate). Denumirea "heterofil" s-a atribuit reactiilor încrucisate pe care le produc antigene neînrudite.

Regnul animal poate fi împartit în specii *Forssman pozitive* (cobai, hamster, soarece, oaie, capra, cal, pisica, câine, pui de gaina etc.) si specii *Forssman negative* (om, iepure, sobolan, maimute, bou, gâsca). Nici unele nici altele nu au vreun grad de înrudire genetica.

Absenta antigenului Forssman pe suprafata celulelor tisulare la iepure, este foarte importanta din punct de vedere practic. Serul imun anti-antigen Forssman se obtine prin imunizarea iepurelui cu o suspensie de hematii de berbec. In contact cu hematiile de berbec, serul imun obtinut pe iepure, produce aglutinarea lor, iar în prezenta complementului se produce liza. Anticorpii specifici fata de antigenele hematiei de berbec dau reactie încrucisata cu antigenele tisulare ale grupului Forssman, dar si cu antigene de origine bacteriana. Antigene de tip Forssman s-au identificat ulterior, prin reactii serologice, în celulele unor bacterii patogene (*Str*. *pneumoniae, Shigella, Salmonella*) si chiar în celulele microbiotei din tractul digestiv, ceea ce explica prezenta anticorpilor naturali anti-hematie de berbec, în serul uman.

Reactiile imune încrucisate pe care antigenele de tip Forssman le dau cu serul imun obtinut fata de unul din antigenele grupului se explica prin asemanarea structurii chimice a acestor molecule. Cele mai multe antigene heterofile sunt *glicoproteine sau glicolipide*, în care gruparile glucidice au rolul de *haptene*. Componentele glucidice ale antigenelor heterofile sunt foarte asemanatoare din punct de vedere chimic, chiar

daca apartin unor organisme cu pozitie sistematica foarte diferita. Antigenul Forssman este un glico-sfingolipid, la care determinantul antigenic este format din doua resturi de N-acetil-galactozamina.

Polizaharidele antigenelor de tip Forssman, în stare purificata, nu sunt imunogene, sunt rezistente la fierbere si chiar la autoclavare.

Cele mai importante sisteme heterofile sunt cele cu semnificatie biologica sau importanta medicala: sistemul Forssman, sistemul Paul-Bunnell (P-B) si sistemul Hanganutziu-Deicher(H-D).

Anticorpii caracteristici *mononucleozei infectioase* (Paul si Bunnell, 1932) apar la 90% dintre pacientii infectati cu virusul Epstein-Barr si sunt IgM care se evidentiaza într-o reactie de aglutinare cu eritrocite de ovine sau bovine. Anticorpii serici recunosc doua antigene distincte: un antigen prezent numai pe eritrocitele bovine (B) si un al II-lea antigen, existent atât pe eritrocitele de bovine cât si pe cele de ovine (BS). Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa sintetizeaza anticorpi anti-B si anti-BS, dar o mica proportie contin numai anticorpi anti-B. Anticorpii P-B se sintetizeaza fata de un antigen, ce pare a fi o glicoproteina codificata de virus.

Anticorpii H-D, descrisi de Hanganutziu (1924) si Deicher (1926) sunt declansatori ai maladiei serului, la pacientii care au primit injectii de ser heterolog. Sinteza lor este indusa de antigenul H-D, care se gaseste în tesuturile mamiferelor, dar lipseste din tesuturile normale umane, însa reapare în unele tesuturi umane patologice (limfoame si mieloame). Din punct de vedere chimic, antigenul H-D este acid N-glicolil-neuraminic.

Alte antigene heterofile. Antigenele grupului Rh se gasesc pe eritrocitele maimutei *Macaccus rhesus* si pe eritrocitele a circa 85% dintre indivizii umani.

Antigenul H de pe eritrocitele umane de grup 0 este foarte asemanator cu un polizaharid al celulelor de *Yersinia pestis* (agentul ciumei), iar antigenul eritrocitar uman de grup A este asemanator cu un antigen al virusului variolei (smallpox). Dezavantajul asemanarii chimice dintre antigenele unor agenti patogeni si antigenele de grup sanguin este evident: indivizii umani de grup sanguin 0 si A reactioneaza mai slab la contactul cu antigenele asemanatoare, iar procesul infectios se instaleaza mai rapid.

O importanta practica deosebita au antigenele heterofile de *T. pallidum* si cele de *Proteus* ox19. Fractia majora a anticorpilor specifici fata de *T. pallidum* aglutineaza o suspensie de celule bacteriene de *Proteus* ox19. Aceiasi fractie a anticorpilor se combina cu *cardiolipina*, ceea ce permite ca în reactia de fixare a complementului pentru determinarea infectiei cu *T. pallidum* sa se utilizeze antigenul cardiolipinic, mult mai usor de obtinut.

Adjuvantii

Substantele sau amestecurile de substante, care în asociatie cu un antigen sau injectate simultan cu acesta, intensifica raspunsul imun specific fata de antigenul respectiv sunt denumite *adjuvanti* (*adjuvere*, latin = a ajuta).

Punctul de plecare al introducerii adjuvantilor în practica imunologica a fost un fapt de observatie: dupa asocierea unui vaccin bacterian celular, cu un vaccin macromolecular (anatoxina), raspunsul imun antitoxina este mult mai intens decât în cazul în care cele doua vaccinuri se administreaza separat. Dupa injectarea vaccinului celular anti-tifoparatific A si B, împreuna cu anatoxina tetanica (TAB), titrul anticorpilor fata de anatoxina tetanica este de 20-30 de ori mai mare decât în cazul injectarii separate a anatoxinei tetanice. Explicatia acestui fenomen a fost data ulterior: la locul injectarii vaccinului, corpii celulari bacterieni determina un proces inflamator, adica un aflux local de celule efectoare ale raspunsului imun (limfocite, macrofage). Macrofagele capteaza si fixeaza anatoxina într-un stoc, de unde este eliberata treptat si astfel se prelungeste durata de stimulare a sistemului imunitar.

Cel mai cunoscut si folosit pentru studiul experimental al imunogenitatii antigenelor este adjuvantul Freund, o emulsie de apa în ulei mineral de parafina. Antigenul se suspenda în apa. Emulsia de apa în ulei se realizeaza cu un emulgator care contine grupari lipofile si hidrofile (lanolina, arlacel A). Acesta este adjuvantul *Freund incomplet.* Dupa adaugarea celulelor omorâte de *M. tuberculosis*, rezulta adjuvantul *Freund complet*. Principiul imunostimulator al celulelor de *M. tuberculosis* este reprezentat de glicolipidele si glicolipopeptidele(denumite ceruri) din structura peretelui celular. Glicolipopeptidele sunt formate din *acizi micolici* esterificati cu un polizaharid (arabinogalactan) ce contine arabinoza, galactoza, manoza, la care se leaga un fragment peptidic ce contine D si L-alanina, acid D-glutamic, acid diaminopimelic.

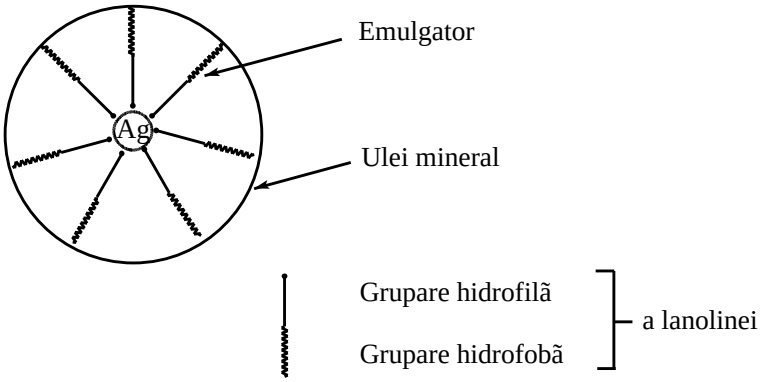


Fig. 9. Reprezentarea schematica a interactiunii moleculelor componente ale *adjuvantului Freund*.

Adjuvantul Freund determina urmatoarele efecte: a) persistenta antigenului în organism prin întârzierea degradarii sale si eliberarea treptata în circulatie; b) picaturile de emulsie vehiculeaza antigenul pe cale limfatica, în tot organismul, inclusiv spre ganglionii limfatici, unde se va declansa raspunsul imun; c) adjuvantul Freund complet si incomplet fac imunogene doze mici de antigene, care altfel nu ar fi imunogene si maresc semnificativ titrul anticorpilor fata de oricare antigen.

Amestecul de adjuvant si antigen se administreaza subcutan sau intradermic. Administrarea intravenoasa anuleaza efectul adjuvantului. Este posibila administrarea decalata la interval de câteva zile (mai întâi a adjuvantului), daca cele doua injectari se fac în acelasi loc.

Efectul stimulator al adjuvantului Freund este foarte intens pentru dozele mici de antigen. Este foarte eficient în asociatie cu antigenele proteice, stimulând sinteza IgG. Utilizarea sa la om este limitata de efectele secundare pe care le produce (artrita de adjuvant).

Endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Salmonella, Brucella, Bordetella* etc.) au efect adjuvant. Ele sunt în acelasi timp adjuvanti, antigene, toxine si factori pirogeni. Efectul maxim se obtine numai daca endotoxina se administreaza simultan sau la mai putin de 6 ore dupa injectarea antigenului. Nu se adauga vaccinurilor umane pentru ca produce febra.

Sarurile de aluminiu ($Al(OH)_3$, $Al(SO_4)_2$. 12 H_2O), fosfatul de aluminiu) si cele de *calciu* au efect adjuvant, deoarece se combina cu imunogenul si formeaza un complex insolubil la situsul subcutan sau intramuscular al injectarii, marind intervalul de timp în care celulele imunitare pot fi activate. Se stimuleaza afluxul de fagocite si functia de

fagocitoza.

Compusii aluminiului sunt singurii adjuvanti acceptati în clinica umana si veterinara, desi prezinta unele dezavantaje: stimuleaza raspunsul imun mediat humoral, dar nu si imunitatea mediata celular; vaccinurile care contin compusi ai Al nu pot fi conservate prin înghet si nici liofilizate si de aceea necesita transport refrigerat.

Alti adjuvanti actioneaza prin stimularea activitatii enzimelor lizosomale. *Vitamina A* si *sarurile de beriliu, de siliciu, sarurile quaternare de amoniu* mobilizeaza macrofagele la locul injectarii si stimuleaza activitatea lor fagocitara si degradativa.

Capitolul 2

IMUNOGLOBULINELE (ANTICORPII)

Existenta anticorpilor a fost demonstrata de Behring si Kitasato (1890), în serul animalelor imunizate experimental cu toxina tetanica. Serul lor neutralizeaza toxina *in vitro* si o face inofensiva pentru animalele de experienta. Autorii au folosit denumirea de "anticorp" pentru a desemna substantele protectoare ce apar în ser, cu specificitate fata de un antigen corpuscular (bacterii).

Heidelberger (1930) a purificat anticorpii din ser si a evidentiat ca apartin fractiei *proteice*. Tiselius si Kabat (1938) au demonstrat experimental ca, de cele mai multe ori, functia de anticorp este asociata cu *fractia gama a proteinelor serice* si le-au dat denumirea de *gamaglobuline.*

În 1970, prin consens între specialisti, OMS a stabilit ca substantele cu proprietati de anticorp, sa fie grupate în categoria *imunoglobulinelor*, pornind de la faptul ca toate substantele din acest grup au functie imunitara si sunt cuprinse în fractia globulinica a serului. Anticorpii nu sunt numai gamaglobuline. Exista si alte globuline cu functie de anticorp, dupa cum exista si gamaglobuline care nu au activitate de anticorp (de exemplu, proteinele patologice Bence-Jones).

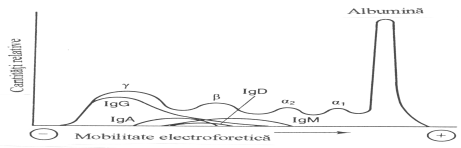


Fig. 10. Mobilitatea *electroforetica* a imunoglobulinelor serice. IgG are cea mai heterogena sarcina electrica si migreaza în regiunile gama si beta. IgE are are mobilitate similara cu a IgD, dar nu poate fi identificat pe electroforegrama datorita nivelului seric scazut.

Anticorpii sunt imunoglobuline care se sintetizeaza în organism dupa patrunderea unui antigen si au proprietatea de a se cupla specific cu antigenul inductor si de a-i anihila actiunea nociva. Termenul de "anticorp" în acceptiunea sa actuala, a fost folosit de Ehrlich (1891) în lucrarea "Studii experimentale asupra imunitatii".

Anticorpii formeaza 20% din totalul proteinelor plasmatice, dar se

gasesc si în lichidele extravasculare, în secretiile exocrine (saliva, lapte, lacrimi) si ca molecule *receptor de anti-gen* pe suprafata limfo-citelor B.

Moleculele de anticorpi au cea mai mica mobilitate electroforetica. Desi sunt asemanatoare ca structura, moleculele de imunoglobuline formeaza o familie de o *diversitate imensa*, neîntâlnita la nici o alta proteina. Diversitatea lor uriasa este ordonata în clase si subclase, în primul rând pe baza compozitiei în aminoacizi. Heterogenitatea compozitiei în aminoacizi se reflecta în sarcina lor electrica, foarte diferita. La electroforeza, celelalte proteine serice migreaza ca o banda compacta, cu o mobilitate caracteristica, deoarece moleculele lor sunt omogene în ceea ce priveste sarcina electrica, la un pH dat. Imunoglobulinele migreaza ca o banda larga, fiind heterogene, nu numai prin secventa aminoacizilor, ci si prin sarcina electrica.

Structura moleculei de imunoglobulina

Structura moleculei de imunoglobulina (Ig) s-a stabilit prin analiza proteinelor omogene secretate de plasmocitoame, cu metodologii complexe: biochimice, analitice, cristalografia prin difractie cu raze X.

Unitatea structurala de baza a moleculei de Ig este *monomerul*. Acesta este o unitate tetrapeptidica, formata prin asocierea a doua lanturi grele (H, *H*eavy = greu), fiecare având circa 450 de aminoacizi si o greutate moleculara cuprinsa între 50-76 kD si doua lanturi usoare (L, *L*ight = usor), fiecare având circa 216 aminoacizi si o greutate moleculara de 25 kD. Cele 4 catene polipeptidice sunt legate între ele prin punti S-S si se rasucesc în spirala - atât unul fata de altul, dar si fiecare separat – fata de propria-i axa, rezultând o configuratie tridimensionala, stabilizata prin 16-24 legaturi S-S si prin alte interactiuni necovalente. Monomerul tetrapeptidic tridimensional are forma de T sau de Y.

În functie de secventa aminoacizilor, fiecare lant polipeptidic este alcatuit din doua regiuni distincte:

a) *regiunea constanta* (C) corespunde jumatatii C-terminale a celor 4 catene polipeptidice. Are o secventa relativ uniforma a aminoacizilor si asigura unitatea structurala si functionala a moleculei de Ig;

b) *regiunea variabila* (V) cuprinde o secventa de circa 110

aminoacizi în jumatatea N-terminala a celor 4 catene polipeptidice. Marimea sa nu este fixa, deoarece intervin insertii sau deletii de 3-6 aminoacizi. Regiunile variabile ale fiecarei perechi de catene formeaza *situsul de combinare* al moleculei de Ig, care confera specificitate de legare cu antigenul.

Variabilitatea maxima a secventei de aminoacizi a catenei L se concentreaza în pozitiile 24-34, 50-55, 89-97, iar a catenei H, la secventele 30-36, 50-56, 86-91 si 95-100. Aceste secvente formeaza *regiunile hipervariabile* sau *regiunile determinante de complementaritate* (RDC), fata de configuratia spatiala a epitopului. Aminoacizii acestor secvente intra în alcatuirea situsului de combinare al moleculei de Ig.

Secventele relativ invariante se numesc regiuni cadru (RC) si formeaza 80-85% din regiunea variabila a moleculei de Ig. Variatia secventei aminoacizilor la nivelul regiunilor cadru este limitata la 5%. Secventa regiunilor cadru si a celor determinante de complementaritate alterneaza astfel: RC_1, RDC_1, RC_2, RDC_2, RC_3, RDC_3, RC_4, RDC_4.

Aproape de jumatatea catenelor H se gaseste o secventa de circa 15 aminoacizi, în care sunt grupate toate resturile de cisteina ce formeaza punti S-S intercatenare. Aceasta secventa se numeste *regiunea balama*. Este sensibila la actiunea proteazelor fiind clivata de papaina, pepsina etc. La IgM si IgE, regiunea balama lipseste, dar cea omologa balamalei este clivata de proteaze. Regiunea balama asigura *flexibilitatea* moleculei de Ig, permitând mobilitatea fragmentelor Fab, care, teoretic, pot forma unghiuri variabile, între $0\text{-}180^o$, conferind moleculei o geometrie variabila. Cele 16-24 legaturi S-S ale monomerului tetrapeptidic sunt constante ca numar si localizare pentru diferitele clase de Ig. Se disting 3 categorii de punti S-S:

– *legaturi intercatenare* H-H sau L-H, ale unui monomer. Legaturile L-L s-au descris la IgA_2 si la proteinele Bence-Jones, care sunt dimeri de lanturi L;

– *legaturi intracatenare*, care determina structura tertiara a fiecarui lant polipeptidic.

– *legaturi intercatenare,* între lanturile H ce apartin unor monomeri

diferiti, la IgA_2 si IgM, care formeaza complexe moleculare polimerice:

Domeniile moleculei de Ig se formeaza prin plierea fiecareia din cele 4 catene polipeptidice si prin rasucirea lor în spirala. Domeniile sunt regiuni globulare ale moleculei, legate între ele prin secvente lineare scurte. Domeniile se pliaza într-o conformatie stabila, conferita de secventa proprie de aminoacizi. Comparativ cu secventele lineare, domeniile pliate sunt mai rezistente la proteoliza.

Catena L are doua domenii: unul corespunzator regiunii variabile (VL) si altul corespunzator regiunii constante (CL).

Catena H are 4 domenii: unul corespunzator regiunii variabile (VH) si trei domenii ale regiunii constante: CH_1, CH_2, CH_3.

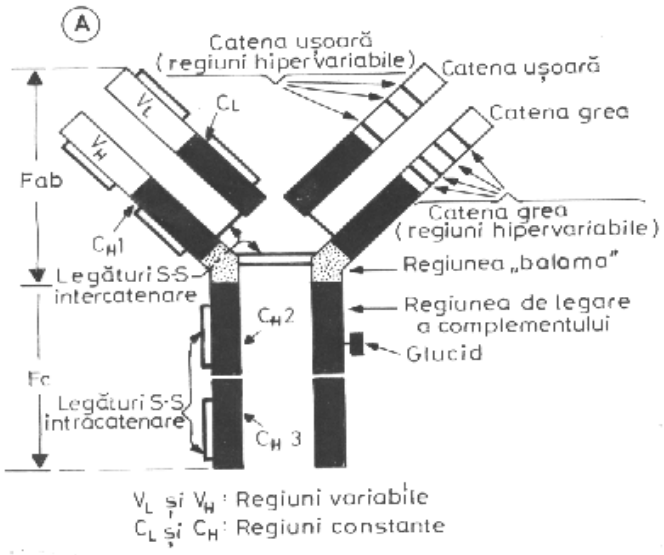


Fig. 11. **a**. Reprezentarea schematica a *structurii primare* a moleculei de imunoglobulina.

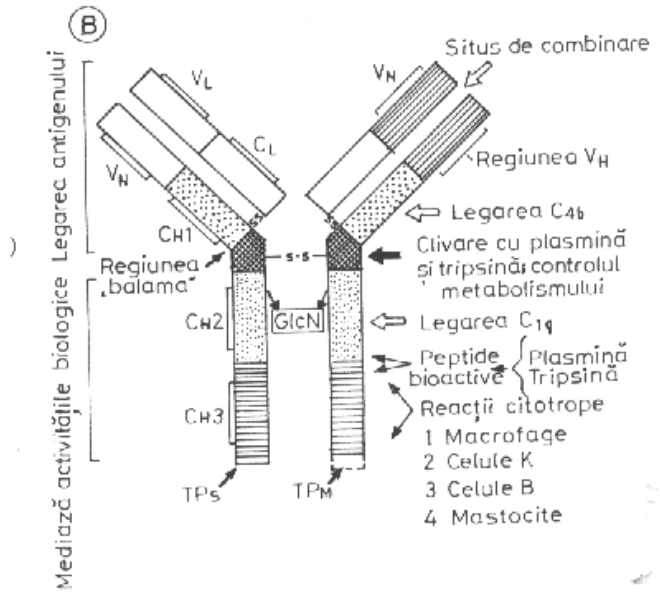


Fig. 11. **b**. Localizarea diferitelor functii ale moleculei de anticorp.

Fiecare catena H a moleculelor de IgM si IgE are 5 domenii: unul în regiunea variabila (VH) si 4 în regiunea constanta ($CH_1 – CH_4$).

Secventa de legatura între regiunea constanta (CH_1) si cea variabila a fiecarei catene se numeste *zona de comutare* (s = switch).

Fiecare domeniu are o forma cilindrica sau globulara, cuprinde o secventa de circa 60 de aminoacizi si este stabilizat prin interactiuni necovalente de tip *trans*, cu domeniul omolog din lantul opus si de tip *cis*, cu domeniul vecin al aceleiasi catene.

Domeniile fiecarui lant, împreuna cu cele omologe ale lantului opus, formeaza unitati functionale denumite *module*. Cooperarea lor functionala este ilustrata de faptul ca domeniile VL si VH separate, au o capacitate foarte limitata de legare a antigenului, în timp ce forma lor asociata (care constituie situsul de legare al moleculei) este foarte eficienta în legarea antigenului.

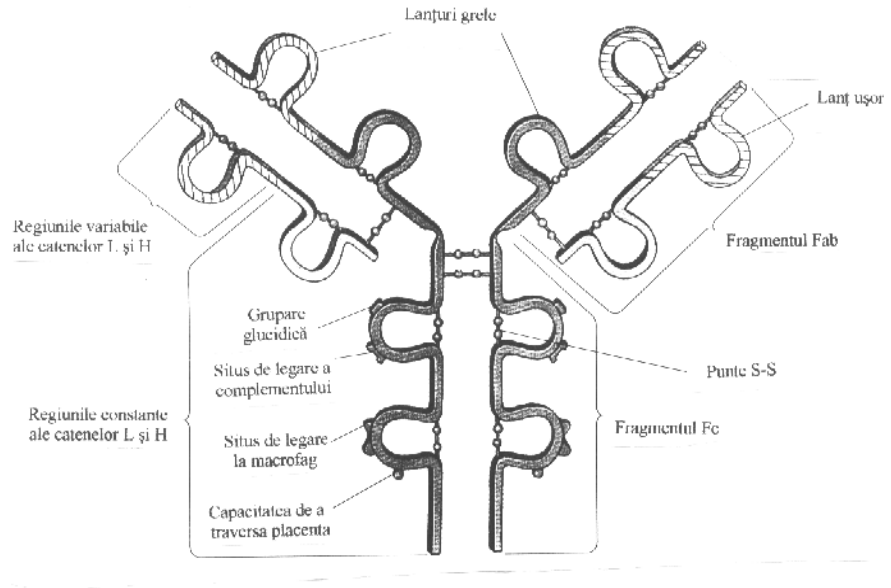


Fig. 12. Reprezentarea schematica a *domeniilor* pliate si stabilizate ale moleculei de IgG.

Moleculele de imunoglobuline exista sub doua forme: *secretate*, ca anticorpi în umorile organismului si *legate* de membrana limfocitelor B, îndeplinind functia de receptori de antigen. Forma legata prezinta o secventa hidrofoba la capatul C-terminal, de circa 30 de aminoacizi, care strabate membrana si se ancoreaza în structura ei.

Metodele de *clivare* si de *denaturare chimica* a moleculei de imunoglobulina au contribuit la întelegerea structurii si functiei sale. Clivarea s-a realizat cu enzime proteolitice (papaina, pepsina, tripsina) sau prin cianoliza cu BrCN.

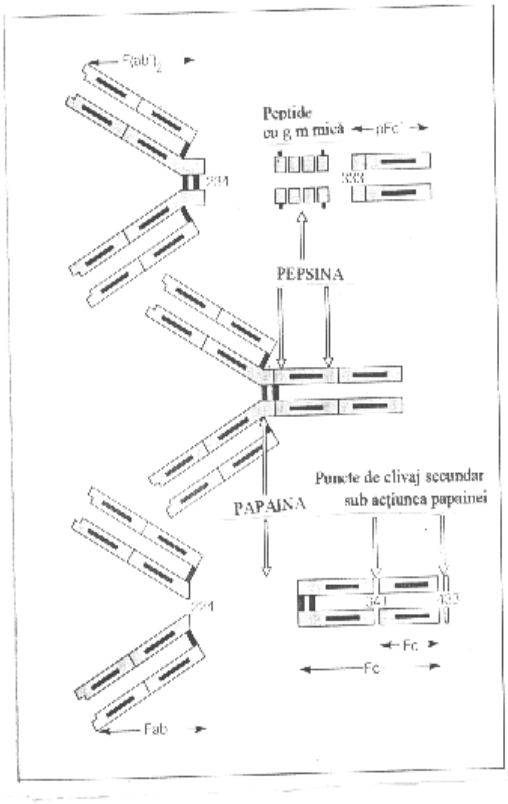


Fig. 13. *Clivajul enzimatic* al moleculei de IgG_1 umane. Pepsina cliveaza catena H si elibereaza fragmentele $F(ab')_2$ si regiunea Fc (segmentul cristalizabil). Hidroliza prelungita taie fragmentul Fc' în peptide scurte. Papaina cliveaza molecula în regiunea balama (la restul 224) si elibereaza doua fragmente Fab si un fragment Fc (dupa Roitt, 1984).

Papaina scindeaza mo-lecula de imunoglobulina la nivelul regiunii balama (aminoacidul 224) si elibe-reaza doua fragmente *Fab* (*F*ragment *a*ntigen *b*inding) si fragmentul *Fc* (*c*ristalizabil). Fiecare fragment Fab (50 kD) contine un lant L întreg si jumatatea N-terminala a lantului H, notata cu Fd (difficult), care cuprinde domeniile VH si CH_1. Frag-mentul Fab poate fi scindat transversal si rezulta frag-mentul Fv (variabil) format din domeniile VL si VH, se-parat de domeniile CL si CH_1.

Fragmentul Fc (50 kD) este format din jumatatile C-terminale ale celor doua catene H, unite printr-o legatura S-S si prin legaturi necovalente.

Pepsina cliveaza lan-turile H sub regiunea balama si elibereaza fragmentul Fc', mai mic decât fragmentul Fc papainic si doua fragmente

Fab' legate între ele $(Fab')_2$, prin punti S-S intercatenare.

BrCN scindeaza lanturile polipeptidice la nivelul secventelor cu Met, pe care o transforma în homoserina. Fragmentele rezultate sunt heterogene ca marime, în functie de frecventa metioninei. Polipeptidele rezultate prin clivare enzimatica, cât si prin cianoliza, se separa prin tehnici cromatografice.

Denaturarea moleculei de imunoglobulina prin reducerea legaturilor S-S. Agentii reducatori (mercaptoetanolul, mercaptoetanolamina, ditiotreitolul) au o grupare SH libera si reduc legaturile S-S intercatenare si intracatenare.

$$HO - CH_2 - CH_2 - SH \text{ (Mercaptoetanolul)}$$

Legaturile intercatenare (H-H sau H-L) sunt reduse mai usor, iar cele intracatenare, care stabilizeaza buclele domeniilor moleculei de imunoglobulina, sunt disociate mai greu.

Reducerea legaturilor S-S este reversibila. Dupa îndepartarea agentului denaturant, renaturarea este rapida si completa. Din acest motiv, agentii denaturanti se încorporeaza în sistemul supus denaturarii. Denaturarea se poate stabiliza prin diferite metode chimice.

Functiile moleculei de imunoglobulina

În ansamblul efectorilor sistemului imunitar, moleculele de imunoglo-bulina îndeplinesc doua categorii de functii:

– functii de *specificitate*

– functii grupate sub denumirea de *activitati biologice efectoare*

Specificitatea imunoglobulinei fata de un antigen este exprimata prin capacitatea de recunoastere fina a epitopului complementar al antigenului si de combinare cu acesta. Specificitatea moleculei de imunogobulina este conferita de situsul sau de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi, asigura o diversitate uriasa a situsurilor de combinare, de ordinul a $10^8 – 10^9$ specificitati de legare.

Specificitatea de legare este data de structura spatiala a situsului de combinare cu antigenul, conferita de resturile de aminoacizi ale regiunilor hipervariabile ale catenelor H si L.

Aminoacizii care formeaza situsul de combinare al moleculei de imunoglobulina, prin plierea regiunilor hipervariabile, delimiteaza o *cavitate moleculara* ce difera ca forma si marime.

Cavitatea prezinta substructuri (proeminente si depresiuni), pe care le formeaza secventele hipervariabile, în timp ce restul regiunilor variabile ale celor doua catene confera structura tridimensionala a cavitatii moleculare.

Potrivirea spatiala dintre situsul de combinare al moleculei de anticorp si epitopul specific, din punctul de vedere al configuratiei spatiale, este perfecta. Eventualele imperfectiuni geometrice pot fi ocupate de moleculele de apa. Potrivirea perfecta a celor doua unitati combinante este sugerata de metafora “cheie-broasca”.

Dupa combinarea cu antigenul, modificarile spatiale ale situsului de combinare a anticorpului sunt minime, nedectabile. Epitopul antigenic are un rol important în potrivirea conformationala perfecta cu situsul de combinare a anticorpului, deoarece corespunde unei regiuni moleculare cu factor de temperatura mai ridicata, ceea ce sugereaza o flexibilitate mai accentuata a secventei moleculare respective.

Flexibilitatea unui determinant antigenic îi permite sa se adapteze mai usor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorp, chiar daca epitopul nu se potriveste exact geometriei situsului de combinare a anticorpului. Datorita flexibilitatii epitopului, legarea antigenului cu anticorpul se aseamana cu “întâlnirea a doi nori” si nu cu aceea a “doua pietre”.

Anticorpii specifici fata de secventele peptidice mobile (calde) ale antigenului proteic, se leaga cu afinitate mai mare de proteina nativa. Aceste rezultate sunt foarte importante din punct de vedere practic, pentru selectarea segmentelor peptidice în vederea obtinerii vaccinurilor sintetice subunitare.

Dimensiunile situsului de combinare s-au dedus indirect, prin determinarea marimii haptenei care blocheaza reactia de combinare a anticorpilor cu antigenul nativ: oligozaharidul format din *6-8 unitati monomerice* ocupa complet situsul de combinare al moleculei de anticorp. Oligozaharidele mai mici inhiba partial reactia specifica de precipitare. Pentru anticorpii specifici fata de antigene proteice, *tetrapeptidele* au blocat cu maxima eficienta reactia de precipitare dintre anticorpi si antigenul nativ.

Functiile biologice efectoare sunt amorsate de reactia antigen-anticorp. Numarul functiilor biologice efectoare este mai mic si sunt dependente de regiunile constante ale moleculei de imunoglobulina.

Fiecare domeniu al regiunii constante a moleculei de imunoglobulina îndeplineste anumite functii:

– legarea antigenului pe imunoglobulinele de suprafata care functioneaza ca receptori pe limfocitele B, declanseaza *proliferarea si diferentierea* lor, iar legarea antigenului cu imunoglobulinele citotrope pentru mastocite, declanseaza *degranularea* acestor celule;

– dupa cuplarea cu antigenul, moleculele de imunoglobulina expun fragmentul Fc, recunoscut ulterior de receptorii specifici pentru Fc de pe suprafata monocitelor, macrofagelor, PMNN. Astfel se stimuleaza

procesul de fagocitoza a celulelor nonself tapetate cu imunoglobuline, denumit *imunofagocitoza;*

– celulele K, prin intermediul receptorilor pentru Fc, interactioneaza cu celulele nonself tapetate cu IgG si realizeaza liza de contact prin fenomenul de *citotoxicitate*;

– interactiunea antigen-anticorp genereaza un semnal care se transmite regiunii Fc. Aceasta îsi modifica configuratia spatiala si expune un *situs de recunoastere* (pentru IgG situat între Glu 318 si Lys 322), de care se leaga C1q;

– regiunea balama este transductoare de semnale si are un rol important în flexibilitatea moleculei de imunoglobulina, permitând variatia unghiului dintre fragmentele Fab: ele trec reversibil de la forma T la Y. Geometria variabila a moleculei de imunoglobulina mareste eficienta de legare a antigenului, deoarece ajusteaza pozitia celor doua situsuri de combinare ale anticorpului, în functie de distanta la care se gasesc determinantii antigenici pe suprafata unui antigen particulat (virus sau celula);

– regiunea balama a moleculelor de IgG si IgD este sensibila la actiunea enzimelor proteolitice, iar a moleculei de IgA este rezistenta.

Componenta glucidica a imunoglobulinei îndeplineste urmatoarele functii;

– realizeaza si mentine o conformatie a moleculei de imunoglobulina, esentiala pentru secretie;

– mareste solubilitatea moleculelor de imunoglobulina;

– are rol de spatiator între domeniile unui lant si între catenele moleculei;

– participa la functiile citotrope ale moleculei de imunoglobulina;

– are rol în legarea C1q, componenta a sistemului complement .

Heterogenitatea anticorpilor

Moleculele de imunoglobuline din plasma oricarui organism sunt foarte heterogene, atât datorita diversitatii epitopilor fata de care s-au sintetizat – ceea ce induce variatii ale secventelor hipervariabile ale moleculei, cât si datorita variatiilor secventei de aminoacizi în regiunile constante ale moleculei.

Heterogenitatea anticorpilor este ordonata în *clase, subclase, tipuri, alotipuri* si *idiotipuri*, pe baza variatiei secventei de aminoacizi. Moleculele de imunoglobuline au calitati duble: ele se comporta nu numai ca *molecule de recunoastere*, care recunosc specific antigenul,

dar la rândul lor sunt recunoscute ca *antigene*. Pentru sporirea gradului de imunogenitate, moleculele de imunoglobuline se asociaza cu adjuvantul Freund si se injecteaza la animale de experienta. Variatiile de structura chimica a imunoglobulinelor se comporta ca determinanti antigenici si induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobulina. Variatiile de ordin chimic ale imunoglobulinelor se evidentiaza prin metode imunochimice de precipitare între moleculele de imunoglobulina cu rol de antigen si anticorpii anti-imunoglobulina din serul imun.

Din punctul de vedere al manifestarii imunopotentei determinantilor antigenici ai imunoglobulinelor, s-au definit trei nivele de heterogenitate: *izotipica, alotipica* si *idiotipica.*

Heterogenitatea izotipica

Heterogenitatea izotipica (*izos* = acelasi) defineste variantele biochimice ale imunoglobulinelor, comune pentru toti indivizii unei specii. Variantele biochimice se datoreaza variatiilor secventei de aminoacizi în regiunea constanta a catenei H. Ele se comporta ca determinanti antigenici dupa injectarea în organismul altei specii. Pentru identificarea epitopilor izotipici ai moleculelor de imunoglobulina umana, acestea, în asociatie cu adjuvantul Freund, se injecteaza la iepure.

Fiecare individ al unei specii exprima toate variantele antigenice izotipice caracteristice speciei.

Variantele antigenice *izotipice* ale imunoglobulinelor umane s-au identificat initial, *în regiunea constanta a catenei H*.

Exista 5 variante antigenice distincte ale catenelor H în regiunea constanta, notate cu γ, μ, α, δ, ε, corespunzatoare celor 5 clase de imunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Serul imun fata de un determinant antigenic de clasa nu da reactii încrucisate cu celelalte tipuri de determinanti, deoarece catenele H ale diferitelor clase de imunoglobuline prezinta diferente mari de ordin chimic între domeniile echivalente, care merg pâna la circa 60% din totalul aminoacizilor.

Determinantii antigenici ai unei clase de imunoglobuline sunt comuni tuturor indivizilor unei specii si se evidentiaza în *serul imun heterolog*, obtinut prin imunizarea organismelor altei specii. De exemplu, un antiser fata de lantul uman γ, obtinut pe iepure, va precipita numai anticorpii clasei IgG din orice ser uman.

Ulterior, determinantii antigenici s-au identificat si *în regiunile constante ale catenelor L*. Determinantii antigenici ai catenelor L determina *tipurile* de imunoglobuline.

Catena L are doua variante antigenice, notate cu *k* si λ, care se gasesc la toate cele 5 clase de imunoglobuline. Cele doua tipuri structurale de lanturi L (k si λ) prezinta deosebiri de secventa a aminoacizilor în regiunea constanta si nu au determinanti antigenici comuni. De aceea, nu dau reactii imune încrucisate. Serul imun heterolog anti-molecule de imunoglobuline umane cu catena Lk, obtinut pe iepure, precipita toate moleculele de imunoglobuline umane care contin catena Lk, indiferent de clasa. Serul imun anti-Lk nu precipita moleculele de imunoglobuline care contin catena L λ.

O molecula de imunoglobulina are doua catene de tip k sau λ. Formula generala a diferitelor clase de imunoglobuline este γ_2k_2 (sau $\gamma_2\lambda_2$), μ_2k_2 ($\mu_2\lambda_2$), α_2k_2 ($\alpha_2\lambda_2$).

Catenele L de tip k si λ determina *tipurile moleculare* de imunoglobuline. La om, raportul Ig k/ λ este 7/3, iar la soarece este 19/1, valori care probabil reflecta raportul numeric al genelor codificatoare pentru cele doua tipuri de catene.

Izotipurile catenelor H nu influenteaza functia de specificitate a moleculelor de imunoglobuline: acelasi antigen poate fi legat de oricare din cele 5 clase de imunoglobuline.

Pe lânga variantele antigenice mentionate – clase si tipuri – s-au identificat diferente mai subtile ale moleculelor de IgG si IgA, în ceea ce priveste proprietatile fizice, chimice si biologice, diferente care corespund *subclaselor* antigenice. Aceasta înseamna ca, pe lânga determinantii antigenici de clasa, exista si alte variante antigenice ale *regiunii constante ale catenei H*, corespunzatoare subclaselor. Ele se noteaza cu litera clasei, urmata de o cifra: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, respectiv IgA_1, IgA_2.

Moleculele de imunoglobuline ale subclaselor au în comun determinantii antigenici proprii fiecarei subclase, aducând un nivel superior de heterogenitate a catenelor H.

Diferentele secventei de aminoacizi ai catenei H, între diferite subclase sunt mici: 24 de aminoacizi între IgG_1 si IgG_4. Cea mai importanta deosebire consta în numarul legaturilor S-S intercatenare.

Moleculele diferitelor subclase sunt sintetizate de celule diferite.

Variantele alotipice

Descoperirea alotipiei (*alos* = altul) a pornit de la urmatorul fapt de observatie: în serul pacientilor cu artrita cronica reumatoida se gasesc molecule de tip special, încadrate în categoria factorilor reumatoizi (FR).

Factorii reumatoizi sunt molecule de auto-anticorpi, adica IgM anti- IgG.

Factorii reumatoizi se evidentiaza *in vitro*, prin capacitatea lor de a determina aglutinarea eritrocitelor tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici antieritrocitari (IgG).

Grubb (1956) a observat ca FR seric, uneori, aglutineaza hematiile tapetate cu auto-anticorpi specifici (care se sintetizeaza în anemia hemolitica autoimuna) ale unor pacienti, iar alteori, reactia de hemaglutinare nu se produce, testul evidentierii FR *in vitro* fiind fals negativ. Concluzia reactiei de hemaglutinare pe care, uneori, FR din serul pacientilor de artrita reumatoida o produce asupra hematiilor tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici, a fost urmatoarea: autoanticorpii de pe suprafata eritrocitelor unor indivizi cu anemie hemolitica autoimuna, poseda determinanti antigenici diferiti, pe care FR poate sa-i recunoasca. Astfel s-a dedus ca moleculele de imunoglobulina de la indivizi diferiti, sunt diferite din punct de vedere antigenic. În consecinta, imunizarea unui individ cu imunoglobulinele provenite de la alt individ al aceleiasi specii, determina sinteza anticorpilor fata de determinantii antigenici ai moleculelor imunoglobulinice ale donorului.

Imunoglobulinele sunt aloantigene ineficiente daca sunt injectate ca proteine solubile în organismul uman. De aceea, transfuziile de sânge total, de plasma sau injectarea imunoglobulinelor solubile, de cele mai multe ori, nu induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobuline ale donorului. Moleculele de imunoglobuline devin antigenice dupa asocierea lor cu adjuvantul Freund.

Semnificatia variantelor antigenice alotipice ale moleculelor de imunoglobuline este analoga celei a antigenelor de grup sanguin. Fenomenul este general, adica si alte molecule provenite de la un organism pot fi imunogene pentru alte organisme ale aceleiasi specii, la care se comporta ca aloantigene.

Variantele alotipice ale imunoglobulinelor se detecteaza în reactia de precipitare cu aloantiseruri obtinute pe organisme ale aceleiasi specii, dar cu alotip diferit de acela al organismului donor al antigenului imunoglobulinic.

Variantele moleculare alotipice sunt consecinta existentei genelor alele perechi (aa), o caracteristica generala a organismelor diploide. Prin mutatii succesive, în acelasi locus, apar mai multe alele care formeaza o serie polialelica - a_1, a_2, a_3 …… a_n. Genele alele ocupa acelasi locus pe cromosomii omologi, ca si gena de tip salbatic *a*. Fiecare individ va avea o combinatie de gene alele: aa_1, aa_2 ….. aa_n sau a_1a_2, a_1a_3 ……

a_1a_n, cu variante antigenice distincte.

Alotipurile imunoglobulinelor sunt rezultatul variatiilor secventei aminoacizilor în regiunile constante ale catenelor H si L, ceea ce le confera un grad superior de heterogenitate, consecinta a alelelor codominante la acelasi locus.

Pentru moleculele imunoglobulinice umane s-au descris trei categorii de markeri alotipici:

– factorii Gm (*g*ama *m*arker), numerotati de la 1 la 25, pe catena H a subclaselor de IgG. De exemplu, markerul $G_1m(a)$ pe moleculele de IgG_1 are secventa Asp-Glu-Leu-Thr-Lys, iar moleculele altor indivizi au secventa Glu-Glu-Met-Thr-Lys, adica doi aminoacizi diferiti. Pentru IgG_3 sau descris 14 alele;

– factorii $A_2m(1)$ si $A_2m(2)$, identificati pe catenele H ale subclasei IgA_2;

– factorii Km(Inv), pe catenele Lk, în numar de trei;

– doua variante alelice pentru IgE.

Foarte rar, determinantii antigenici alotipici sunt localizati în domeniile variabile ale moleculei.

Ca si în alte sisteme alelice, indivizii pot fi homozigoti sau heterozigoti pentru genele care codifica markerii. Genele se exprima codominant si se transmit în descendenta dupa mecanismul mendelian. De exemplu, alotipurile b_4b_5 pe catenele L ale imunoglobulinelor de iepure se exprima astfel: un organism homozigot b_4b_4 sau b_5b_5 exprima alotipul b_4, respectiv b_5. Dar genotipul b_4b_5 rezultat în descendenta lor exprima markerul b_4 pe o fractie a moleculelor si markerul b_5, pe restul moleculelor de imunoglobuline.

Variantele idiotipice

Idiotipul (*idios* = individual) este reprezentat de o populatie omogena de molecule de anticorpi, sintetizate de descendentii unei clone celulare, care recunosc si se combina cu un singur determinant antigenic (epitop).

Specificitatea idiotipica a unei populatii de anticorpi s-a dedus pe cale experimentala:

– antigenul (celule de *S. typhi*) s-a injectat la organismele A si B (iepuri), identice din punct de vedere genetic. Se sintetizeaza anticorpi aglutinanti anti *S. typhi*;

– anticorpii aglutinanti 1(produsi de organismul A) s-au injectat la organismul C (iepure din aceiasi linie genetica). Se sintetizeaza anticorpi anti-anticorpi 1, evidentiati în reactia de precipitare.

Surprinzator, anticorpii anti-anticorpi 1 nu precipita anticorpii 2, desi anticorpii 1 si anticorpii 2 au aceiasi specificitate fata de antigenele *S. typhi*, iar organismele A, B, C apartin aceluiasi alotip.

Concluzia este ca anticorpii 1 si anticorpii 2, desi au aceiasi specificitate fata de antigenul de *S. typhi*, la rândul lor, au determinanti antigenici proprii. De aceea, anticorpii anti-anticorpi 1 nu precipita anticorpii 2, sintetizati de un alt organism. Moleculele de anticorpi cu aceiasi specificitate de combinare fata de un antigen, sintetizate de organisme identice genetic, au o individualitate antigenica distincta, denumita *specificitate idiotipica*.

Heterogenitatea idiotipica este consecinta determinantilor idiotipici, localizati în regiunile hipervariabile ale catenelor H si L. Specificitatea idiotipica a moleculelor de anticorpi sintetizati de o clona de celule este conferita de unicitatea secventei de aminoacizi de la nivelul secventelor hipervariabile ce participa la formarea situsurilor de combinare, care determina epitopi cu caracter strict individual denumiti *idiotopi*. Unii idiotopi sunt localizati chiar în interiorul situsului de combinare sau în imediata sa vecinatate. Dovada o constituie faptul ca legarea epitopului specific de situsul de combinare a anticorpului, blocheaza într-o masura mai mare sau mai mica, legarea anticorpilor anti-idiotipici.

Colectia de idiotopi ai situsului de combinare a unei molecule de imunoglobuline formeaza *idiotipul* ei. Idiotipul este rezultatul configuratiei spatiale unice a regiunilor hipervariabile ale catenelor H si L, conferita de o secventa unica a aminoacizilor.

Repertoriul idiotipurilor este de acelasi ordin de marime cu acela al specificitatii situsurilor de com-binare. Pentru situsul de combinare al moleculei de imunoglobulina s-a pro-pus denumirea de *paratop*.

La alcatuirea idiotipului participa ambele catene. Cele doua catene disociate nu pot sa lege anti-idiotipul sau îl leaga cu o eficienta foarte scazuta.

IgG

Imunoglobulinele reprezinta circa 20% din totalul proteinelor serice. IgG este dominanta cantitativ în serul uman normal, reprezentând 70-75% din cantitatea totala de imunoglobuline. Concentratia sa medie în ser este de 1250 mg/100 ml, cu variatii

individuale normale între 800 – 2000 mg/100 ml.

IgG este cea mai heterogena dintre imunoglobuline în ceea ce priveste sarcina electrica. Din aceasta cauza, în câmpul electroforetic se distribuie în fractiile γ 1 si γ 2 ale serului.

Din punct de vedere structural, IgG este un monomer cu greutatea moleculara de 150 kD si cu constanta de sedimentare 7S. Componenta glucidica reprezinta circa 3% din greutatea moleculara a IgG.

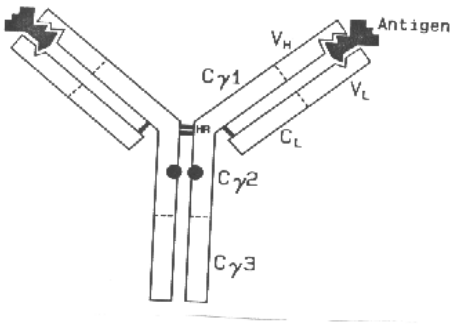


Fig. 15. Modelul *structural* al IgG_1. Domeniile variabile ale celor doua catene (VH si VL) formeaza situsul de legare a antigenului. Cercurile negre indica pozitia gruparilor glucidice. HR = regiunea balama.

IgG se sintetizeaza tardiv în raspunsul imun pri-mar, dar este imunoglobulina predominanta a *raspunsului imun secundar* si se distribuie uniform în compartimentele intra- si extravasculare.

IgG se prezinta sub forma a 4 variante antigenice, conferite de compozitia în aminoacizi a catenei γ: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4. Proportia normala a celor 4 subclase este de 66% pentru IgG_1, 23% pentru IgG_2, 7% pentru IgG_3 si 4% pentru IgG_4.

IgG_3 este mai grea, datorita catenei γ 3 si are o regiune balama extinsa, codificata de câtiva exoni, iar IgG_4 are o regiune balama scurta si rigida, ceea ce produce o nepotrivire sterica pentru fixarea complementului.

IgG este singura imunoglobulina care traverseaza placenta, asigurând astfel protectia fatului si nou-nascutului în primele luni de viata. Pe membrana sincitio-trofoblastului se gasesc receptori pentru regiunea Fc a IgG, care mediaza transferul placentar al moleculei.

In vivo, functia esentiala a IgG este neutralizarea toxinelor bacteriene. IgG activeaza sistemul complement si produce liza celulelor bacteriene si a particulelor virale, dar are si rol opsonizant. *In vitro*, IgG

participa la reactiile de aglutinare si precipitare.

Termenul de înjumatatire al IgG este de 21 de zile.

În toate serurile imune, o proportie de 5-15% din moleculele de IgG, pare sa conste din molecule asimetrice, cu un singur situs functional de legare (molecule monovalente). Aceste molecule nu participa la reactiile secundare *in vitro* (aglutinare, precipitare). Celalalt situs este blocat stereochimic de un polizaharid bogat în manoza, legat de primul domeniu constant (CH_1).

IgA

Unitatea de baza a structurii IgA este *monomerul*, alcatuit din doua catene grele (H) cu specificitate de clasa (izotipica) α si doua catene usoare (L) de tip λ sau k.

Unitatea monomerica $(\alpha\text{-}\lambda)_2$ sau $(\alpha\text{-k})_2$ are o tendinta constanta de a produce structuri moleculare polimerice, formate din 2, 3, 4 sau 5 monomeri (10S, 13S, 15S, respectiv 17-18S), care în ser se gasesc în concentratii descrescânde.

La microscopul eleectronic, molecula de IgA monomera are aspectul literei Y. Complexele dimerice au forma a doua litere Y, asezate una în prelungirea celeilalte. Cele doua fragmente Fc formeaza un lant lung si rigid.

IgA se gaseste atât în plasma sanguina, cât si în secretiile externe: salivara, lacrimala, gastrica vaginala, intestinala, biliara, pancreatica, lactata.

Pe baza unor diferente de structura moleculara (numarul puntilor S-S, secventa aminoacizilor în regiunea balama) au fost descrise doua subclase de IgA: IgA_1 si IgA_2. Ele difera prin 22 de aminoacizi, în primul rând datorita deletiei a 13 aminoacizi din regiunea balama a IgA_2, dar care se gasesc la IgA_1. Aceasta diferenta structurala confera rezistenta moleculei de IgA_2 la actiunea unor proteaze bacteriene, care cliveaza specific IgA_1 în regiunea balama.

În functie de localizare se disting *IgA serica* si *IgA din secretii*.

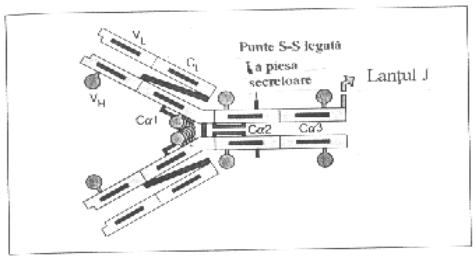


Fig. 16. *Structura* IgA_1 umana. Sunt indicate pozitiile puntilor disulfurice inter- si intracatenare, precum si pozitia ipotetica a catenelor polizaharidice. O punte disulfurica suplimentara stabilizeaza domeniul C α 2 si o alta leaga lantul J în polimerul de IgA.

IgA serica este reprezentata în primul rând de IgA_1 (90%) si este monomera în proportie de 80%. Catenele L si H sunt reunite prin doua punti S-S. Subclasa IgA_2 reprezinta numai 10% din IgA serica. Pe baza markerilor alotipici ai catenei H, IgA_2 se subdivide în doua variante alotipice: A_2m_1 (la populatiile caucaziene) si A_2m_2 (la populatiile mongoloide-negroide)

Functiile IgA seric nu sunt bine precizate, datorita dificul-tatilor de purificare. Rolul sau cel mai important ar fi acela de a îndeparta cantitatile mici de antigene, provenite din alimente sau antigenele solubile ale microorganismelor, absorbite în circulatia generala. Eliminarea timpurie împiedica accesul acestor antigene la celulele sistemului imunitar si stopeaza declansarea unui raspuns imun de amploare, care ar devia fortele de aparare a organismului, de la functia sa esentiala, aceea a protectiei antiinfectioase.

In vivo, IgA nu activeaza complementul pe calea clasica si nu produce liza antigenelor celulare, dar moleculele agregate *in vitro* de IgA_1 si IgA_2 activeaza calea alterna. Functia opsonizanta a IgA este controversata. IgA nu produce reactii de precipitare cu antigenele moleculare.

IgA din secretii (sau IgA secretor) se gaseste în secretia mucoaselor (digestiva, respiratorie, urinara), în secretia biliara si pancreatica. De aici deriva si denumirea sa improprie, *IgA secretoare (sIgA*), desi mai corecta ar fi denumirea de “IgA din secretii”.

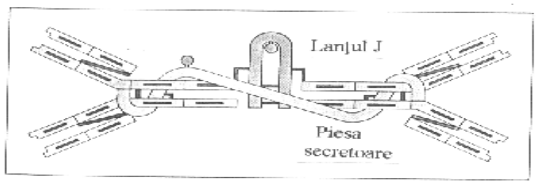


Fig. 17. Stuctura sIgA$_1$ umana. Piesa secretoare, probabil este rasucita în jurul dimerului de IgA si se leaga prin punti disulfurice de domeniul C α 2 al fiecarui monomer. Piesa J este amplasata la jonctiunea celor doi monomeri. Puntea disulfurica ce leaga domeniul C α 2 de regiunea balama nu este figurata (dupa Roitt, 1984).

sIgA se gaseste în special în forma dimerica (80%), iar restul ca monomer sau alt tip de polimer. Compartimentul seric al IgA nu influ-enteaza semnificativ con-centratia IgA din secretii si invers, IgA din secretii nu este absorbit în circulatie.

sIgA se sintetizeaza local, în structurile limfoide asociate mucoaselor: în mucoasa tractului respirator, dar mai ales cea nazala, a tractului digestiv (în special în mucoasa antrului piloric si a intestinului subtire), în lamina propria a acinilor secretori ai glandelor salivare si mamare, în glandele lacrimale. In toate aceste structuri se gasesc numeroase plasmocite si precursorii lor. Imunizarea orala stimuleaza în primul rând, sinteza IgA.

Structura moleculei de sIgA

Molecula de sIgA este alcatuita din doi monomeri de IgA, legati prin *catena J* (joining) si o catena suplimentara, denumita *componenta secretoare* (CS). Formula generala a sIgA dimer este (IgA)$_2$ J CS si are greutatea moleculara de 385 kD si constanta de sedimentare 10S.

Complexul molecular (IgA)$_2$ J CS este foarte rezistent la proteoliza datorita conformatiei speciale dobândita dupa legarea catenei J si a catenei CS, precum si datorita capacitatii sale de a se lega de mucinele din secretii.

Catena J este un glicopeptid de 15-16 kD (136 aminoacizi) si se sintetizeaza în *plasmocitele* producatoare de IgA. Este bogat în acizi glutamic si aspartic si contine un oligozaharid legat de Asp din pozitia 43. Contine 7-8 resturi de cisteina. Lantul J se leaga prin punti S-S de regiunea Fc a IgM polimeric si de sIgA. Prezenta catenei J s-a stabilit la imunoglobulinele polimerice de la toate clasele de vertebrate, iar ARNm pentru catena J s-a detectat la numeroase nevertebrate. In complexele moleculare cu un grad superior de polimerizare, numai doua molecule

de IgA sau IgM se leaga prin intermediul catenei J, celelalte fiind legate una de alta prin punti S-S. Polimerizarea moleculelor de IgA în citoplasma celulei producatoare este esentiala pentru transportul lor la suprafata mucoasei. Lantul J se gaseste în citoplasma limfocitelor B, în cursul diferentierii spre plasmocit. Aproape toate limfocitele din structurile limfoide asociate mucoaselor (digestiva, respiratorie), din tesutul interstitial mamar, salivar si lacrimal, exprima lantul J intracelular. Catena J este sintetizata si de unele celule care produc IgG sau IgD din aceste structuri, dar este degradata în citoplasma. Plasmocitele din maduva osoasa care produc IgA sau IgG sunt negative pentru lantul J.

Componenta secretoare a sIgA este o glicoproteina din categoria betaglobulinelor, neînrudita cu imunoglobulinele, bogata în glucide (8,7%). Secventa catenei cuprinde 750 de aminoacizi, distribuiti în trei domenii: domeniul citoplasmatic (103 aminoacizi), transmembranar (23 aminoacizi) si extracelular (circa 625 aminoacizi), la care se adauga o secventa semnal de 18 aminoacizi, care este clivata dupa sinteza.

Componenta secretoare se sintetizeaza în *celulele epiteliale ale mucoaselor*. Dupa prelucrarea în complexul Golgi (unde are loc glicozilarea), CS migreaza pentru a fi integrata în plasmalema bazala si laterala a celulelor. Sinteza CS este independenta de IgA. La noul nascut, CS se sintetizeaza în saptamâna a 8-a (înainte de aparitia plasmocitelor). Este prezenta chiar la persoanele în ale caror secretii IgA lipseste.

Functiile componentei secretoare. Componenta secretoare are rol de *receptor* pentru moleculele dimere si polimere de IgA si IgM, care au legat lantul J (receptor poli-Ig). Legarea lantului J pare sa determine o schimbare conformationala a acestor molecule. Moleculele de IgA secretate ca monomeri, ca si polimerii care nu au legat lantul J nu se pot complexa cu CS si trec în circulatie.

IgA dimeric trebuie sa ajunga în contact cu celulele epiteliale, pentru a fi transportat la suprafata mucoasei. Teoretic, IgA polimeric poate veni în contact cu celulele epiteliale care au lantul CS inserat în membrana, pe una din urmatoarele doua cai:

– difuzia libera prin tesutul conjunctiv adiacent plasmocitelor din lamina propria a mucoasei, unde are loc sinteza;

– translocatia din circulatie la nivelul capilarelor mucoasei.

Componenta secretoare este inserata în membrana laterobazala a celulei epiteliale. Din aceasta pozitie, prin domeniul sau extracelular, CS leaga dimerii de IgA care contin lantul J, printr-un mecanism necunoscut. Una din ipotezele privind mecanismul legarii presupune ca

CS s-ar înfasura în jurul dimerului de IgA, extinzându-se de la o regiune balama la cealalta, marind astfel rezistenta dimerului la proteoliza. Complexul format este endocitat în vezicule de pinocitoza si este eliberat pe fata luminala a celulelor epiteliale, în secretia lor externa. Un astfel de transport are loc în celulele epiteliale ale mucoasei tubului digestiv, ale mucoasei bronsice, la nivelul epiteliului vezicii biliare si al tractului biliar, al acinilor glandelor mamare, al acinilor pancreatici si salivari. CS leaga chiar complexele imune care contin IgA polimeric, formate în lamina propria a mucoasei. Acestea sunt transferate la suprafata luminala a epiteliului prin acelasi mecanism ca si IgA polimeric. Anihilarea pe aceasta cale a antigenelor este foarte importanta în tractul intestinal, unde componentele antigenice alimentare si ale microbiotei pot dobândi acces la lamina propria.

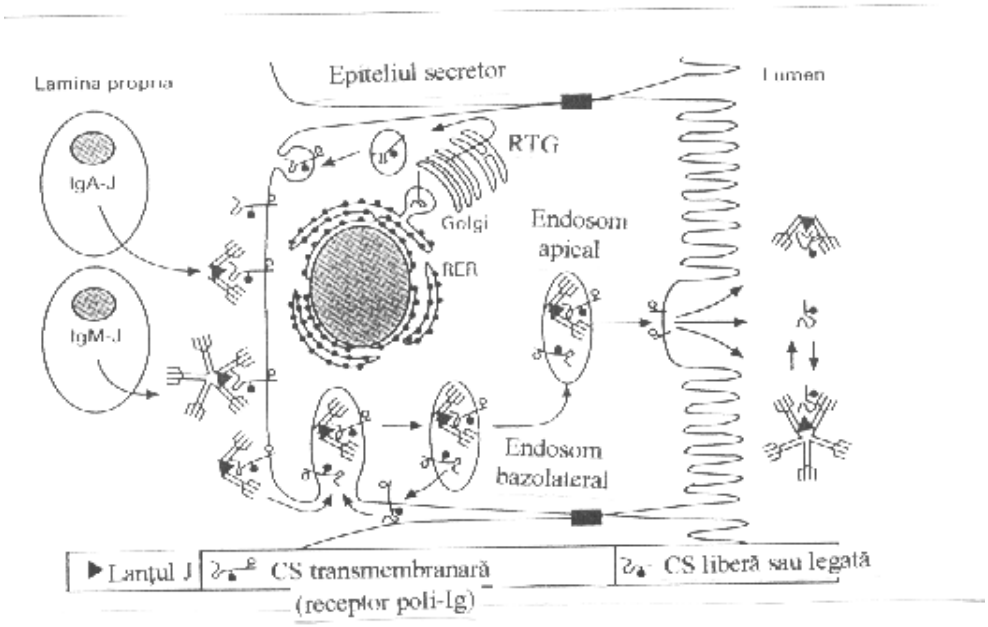


Fig. 18. Reprezentarea schematica a diferitelor trepte care se succed în *generarea sIgA si IgM* umane, pe calea transportului epitelial mediat de receptorul de poli-Ig (pIgR). IgA polimeric care contine lantul J (IgA-J) si IgM pentameric (IgM-J) sunt secretate de plasmocitele locale. Componenta secretorie (CS) este sintetizata în reticulul endoplasmic granular (REG) al celulelor epiteliale si se matureaza prin glicozilare în complexul Golgi. In reteaua transgolgiana (TG), este fosforilat si este expus ca receptor

de poli-Ig, pe membrana plasmatica bazolaterala. Endocitoza ligandului complexat cu receptorul de poli-Ig, ca si a receptorului poli-Ig liber, este urmata de transcitoza la endosomii apicali si în final are loc clivarea receptorului poli-Ig si eliberarea moleculei Ig în secretii (dupa Brandtzaeg si col., 1998).

Rolul CS în transportul IgA la suprafata mucoaselor este argumentat de faptul ca bolnavii cu deficit al sintezei sale, nu au IgA în secretii, desi nivelul IgA seric este normal.

Transportul transepitelial al sIgA este asociat cu o pierdere continua de receptori, care, spre deosebire de alti receptori, dupa exocitoza la suprafata celulei epiteliale nu sunt recirculati si nici nu se refac prin sinteza *de novo*.

Functiile efectoare ale sIgA

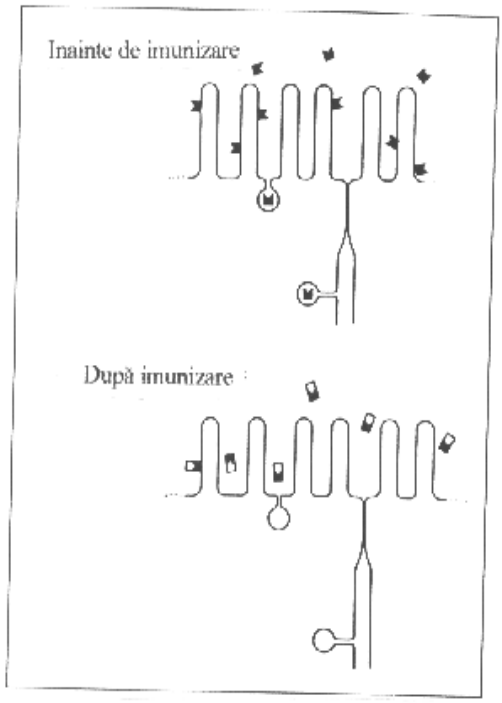


Fig. 19. Reprezentarea schematica a fenomenului de "*excludere imuna*", pe care-l produc anticorpii din secretia mucoasei intestinale. Inainte de imunizare, o mica parte a antigenului proteic ingerat, scapa digestiei intraluminale, este preluat de enterocit si transportat în spatiile intercelulare. Dupa imunizare, anticorpii din secretia intestinala, leaga antigenul formând complexe Ag-Ac. Legarea antigenului la suprafata celulelor epiteliale este blocata. Antigenele complexate cu anticorpii în învelisul mucos, pot fi degradate de enzimele pancreatice adsorbite la supra-fata intestinului. Astfel, scade cantitatea de antigen disponibil pentru absorbtia de catre celulele intestinale.

Studiul functiilor efectoare ale IgA este îngreunat de dificultatile obtinerii sIgA în stare pura.

Functia biologica esentiala a sIgA este apararea organismului fata de antigenele moleculare care ar putea fi înglobate (prin endocitoza) la nivelul mucoaselor (în special cea digestiva) si de a asigura protectia fata de agentii patogeni care tind sa patrunda de la exterior pe calea mucoaselor digestiva, respiratorie, genito-urinara. sIgA formeaza complexe cu urmtoarele tipuri de antigene;

– cu antigenele mole-culare adsorbite la suprafata mucoaselor, având rol în "excluderea imuna" a acestora. Excluderea imuna este o functie majora a sIgA, ce consta în limitarea penetrarii materialelor antigenice prin epiteliul mu-coasei. Deoarece IgA este ine-ficient în activarea comple-mentului si nici nu stimuleaza fagocitoza, excluderea imuna este un mecanism, în primul rând, neinflamator.

– cu antigenele celulare bacteriene, realizând imobi-lizarea si aglutinarea acestora. Astfel, este prevenita patrunderea lor în organism;

– blocheaza legarea virusurilor de receptorii celulelor epiteliului respirator si ale mucoasei digestive;

– neutralizeaza efectul toxinelor (botulinica, tetanica, holerica);

– este imunoglobulina predominanta în saliva si constituie principalul mecanism de aparare în cavitatea orala, prin actiune sinergica cu alti factori antibacterieni (lizozim, lactoferina, peroxidaza salivara si mucine).

Prezenta sIgA în colostru si în lichidul amniotic sugereaza rolul sau foarte important în conferirea imunitatii pasive a noului nascut, atât la om cât si la animale. Rezistenta noilor nascuti, hraniti natural este net superioara comparativ cu a celor hraniti artificial.

Concentratia sIgA în colostrul uman este foarte mare în primele 24-48 de ore de lactatie (6-88 mg/ml) si diminua brusc datorita dilutiei într-un volum secretor mult sporit. Concentratia foarte mare a sIgA în colostru se datoreaza eliberarii unor cantitati mari într-un volum mic de secretie. Glanda mamara are un numar relativ mic de celule producatoare de anticorpi, deoarece nu este stimulata antigenic. Originea sIgA în glanda mamara are doua surse:

– o sinteza locala foarte intensa în plasmocitele din tesutul conjunctiv subiacent epiteliului acinilor glandulari;

– transportul IgA din sânge.

sIgA din secretia mamara, la nivelul mucoasei digestive a noului nascut, nu este transportat în circulatia acestuia decât într-o mica masura, în primele ore de viata (la om) sau zeci de ore la alte mamifere.

La unele mamifere (ovine, bovine), sIgA din secretia lactata materna este transportat foarte activ în circulatia noului nascut. Efectul protector antiinfectios al sIgA de origine materna se exercita prin faptul ca moleculele ramân legate de celulele epiteliale ale mucoasei digestive si blocheaza astfel aderenta microorganismelor si a virusurilor.

Moleculele de IgA nu sunt transferate prin placenta. Sângele noului nascut nu contine IgA. Nivelul seric al IgA caracteristic adultului, este atins la 9-10 luni.

În conditii naturale, în tractul intestinal se sintetizeaza IgA fata de multe antigene exogene. IgA din secretia intestinala poate sa treaca intacta prin tubul digestiv si sa-si pastreze activitatea.

Persoanele cu deficit congenital al IgA (1/500-700) au sensibilitate mare la infectiile mucoaselor, desi celulele epiteliale sintetizeaza CS. Aceleasi persoane sunt predispuse la maladii autoimune, deoarece, în absenta sIgA, mucoasa digestiva este traversata de o mare diversitate de antigene, care induc sinteza unor anticorpi ce interactioneaza nu numai cu antigenul exogen inductor, ci si cu componente moleculare proprii.

In vivo, sIgA nu activeaza cascada complementului, dar moleculele agregate artificial, *in vitro*, activeaza calea alterna.

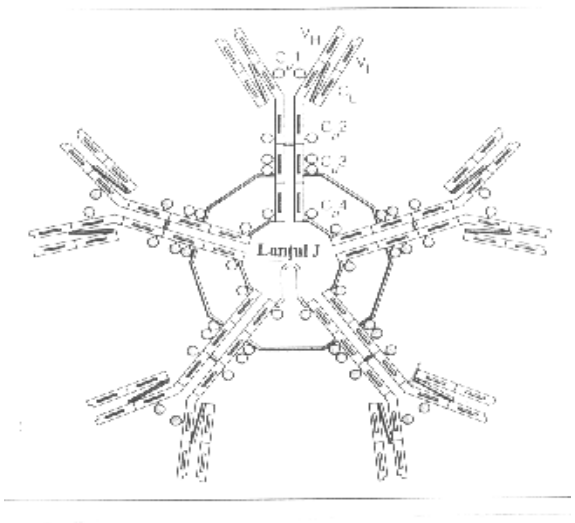


Fig. 20. Structura IgM pentameric. Catenele grele de IgM uman au 5 domenii. Monomerii sunt legati prin punti disulfurice între domeniile Cμ3 si Cμ4. Sunt reprezentate catenele oligozaharidice, ca si pozitia ipotetica a catenei J

(dupa Roitt, 1984).

IgM

Caracteristica struc-turala a IgM este prezenta unui lant greu al izotipului μ, alcatuit din 576 aminoacizi. IgM contine 5 grupari prostetice oligozaharidice, care constituie 12% din greutatea moleculara totala. Secventa de aminoacizi a lantului H cu specificitate antigenica μ este organizata în 5 domenii: unul variabil si 4 constante ($C\mu_1$, 105 amino-acizi – $C\mu_4$, 111 aminoacizi), codificati de exoni diferiti. Lipseste regiunea balama, fiind înlocuita cu domeniul CH_2, sensibil la actiunea proteazelor.

IgM se gaseste sub doua forme:

– *monomera*, legata de membrane

– *polimera*, libera în ser.

IgM legat de membrana unor limfocite, are în plus o secventa COOH-terminala, hidrofoba, formata din 41 de aminoacizi, care întrerupe transportul lanturilor μ prin membrana si ancoreaza molecula în structura sa. IgM este molecula majora cu rol de receptor de antigen, pe suprafata limfocitelor B.

IgM serica are structura unui pentamer ($L_2\ \mu_2$), cu greutatea moleculara de 950 kD. Fiecare pentamer contine un lant polipeptidic J, bogat în cisteina, foarte acid, cu rol în polimerizarea monomerilor. Cele 5 unitati monomere sunt asezate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru, unite prin punti S-S, formate între domeniile CH_3 si prin lantul J. Bratele $(Fab)_{10}$ sunt orientate spre exterior, chiar în unghi drept fata de discul $(Fc)_5$

La microscopul electronic, pentamerul IgM are aspect de stea cu 5 brate, dispuse în jurul discului central. Fiecare brat are forma literei Y. Bratele pot lua pozitii diferite, ceea ce denota existenta unei zone mobile pentru fiecare subunitate. Fiecare unitate monomerica este mobila la nivelul articulatiei în discul central, astfel ca dupa legarea cu epitopii de pe o suprafata membranara, IgM poate adopta configuratia asemanatoare unui crab, iar regiunile multiple Fc devin accesibile lui C1q.

IgM poate sa existe în forma hexamerica, de 10-20 de ori mai eficienta în liza mediata de activarea C, decât în varianta pentamerica.

Valenta pentamerului este teoretic 10, dar aceasta s-a determinat numai în reactia cu haptenele mici. In reactia cu antigenele complexe, valenta scade la 5 sau chiar mai putin, datorita probabil insuficientei flexibilitati a moleculei. Valenta IgM este dependenta de natura

ligandului.

Functiile IgM. IgM este receptorul major de antigen pe suprafata limfocitelor B mature.

IgM seric are functii *aglutinante*, fiind de 1000 de ori mai eficient decât IgG în legarea antigenelor particulate. IgM reprezinta 5-10% din cantitatea totala de anticorpi serici, cu valori normale între 84-170 mg la 100 ml de sânge.

IgM activeaza complementul(C), producând liza antigenului celular si ingestia rapida a complexelor solubile. De aceea, IgM este foarte eficient în reactia de aparare fata de bacteriemii si fata de toxine(difterica, tetanica, botulinica, toxina din veninul de sarpe).

IgM este principala opsonina imunoglobulinica a serului.

Afinitatea IgM (care semnifica forta de legare dintre un epitop si un paratop) poate sa fie slaba, dar *aviditatea* globala (energia medie a interactiunii IgM cu epitopii multipli ai unui antigen) este foarte mare fata de antigenele complexe si fata de celule, ambele având epitopi repetitivi.

Cea mai mare parte a anticorpilor IgM se sintetizeaza în stadiul timpuriu al raspunsului imun primar fata de un antigen. IgM se sintetizeaza ca rezultat al activarii policlonale, nespecifice, a limfocitelor B, produsa de virusul Epstein-Barr la om sau de LPS la soarece. Anticorpii sintetizati dupa stimularea policlonala a limfocitelor, leaga o varietate de antigene: virusuri, bacterii, protozoare, paraziti si fungi.

În plasma se gasesc anticorpi “naturali” sau “spontani” a caror sinteza are loc în afara stimularilor antigenice. Termenul “natural” se foloseste pentru a distinge aceste imunoglobuline, de cele care se sintetizeaza dupa imunizare. Majoritatea anticorpilor naturali apartin izotipului IgM. Ei reactioneaza nu numai cu o diversitate de antigene nonself, ci si cu molecule self: cu hormoni (insulina, tiroglobulina), cu constituienti celulari (ADN, miozina, actina, tubulina etc.), cu fragmentul Fc al IgG autolog (FR = factorul reumatoid).

IgM reprezinta forma sub care se gasesc anticorpii naturali ai grupelor sanguine (aglutininele α si β), precum si anticorpii fata de antigenul somatic O (endotoxina) al bacteriilor Gram negative sau cei detectabili prin reactia Wassermann, dupa infectia cu T. *pallidum*.

IgM trece greu sau nu trece în lichidele interstitiale si nici prin bariera placentara.

Nivelul seric al IgM de la adult este atins la 10 luni. IgM este izotipul cel mai bine conservat în evolutie, fapt evidentiat prin relativa constanta a secventei de aminoacizi.

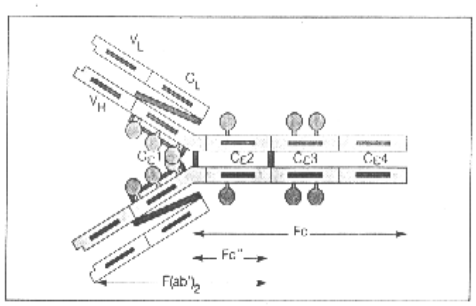


Fig. 21. Structura IgE umana. Molecula este formata din 4 domenii constante si un domeniu variabil. Este indicata pozitia puntilor disulfurice inter- si intracatenare, precum si pozitia catenelor oligozaharidice. Clivajul enzimatic al IgE poate elibera fragmentele F(ab')2, fragmentele Fc si Fc'.

IgE

Denumirea de IgE vine de la "eritem", deoarece aceasta clasa de anticorpi este unul din mediatorii reactiilor vasculare eritematoase.

IgE a fost izolata si caracterizata de Ishizaka (1966), dintr-un mielom producator al acestui izotip. Molecula de IgE are doua catene L identice cu catenele L ale celorlalte clase de imuno-globuline si doua catene grele H cu specificitate antigenica ε, fiecare cu câte 550 de aminoacizi, distribuiti în 5 domenii: 4 domenii în regiunea constanta si unul în regiunea variabila. Catenele H sunt reunite prin doua legaturi S-S, localizate în domeniul C_2.

Continutul glucidic este de pâna la 11,7%.

IgE este sintetizata în celule din mucoasa respiratorie, gastrointestinala si în ganglionii regionali.

În sânge, IgE se gaseste în concentratii foarte mici (250 ng/ml). Nivelul sau caracteristic adultului este atins la 10-15 ani. IgE nu strabate bariera placentara.

Concentratia serica a IgE creste în parazitoze si în starile alergice. In cazurile de astm alergic, concentratia IgE ajunge la 1550 ng/ml.

IgE este o molecula *citotropa*: interactioneaza *in vivo* prin regiunea Fc, cu receptorii specifici de pe suprafata mastocitelor si bazofilelor, dar si *in vitro* cu celulele aceleiasi specii sau ale speciilor înrudite. Incalzirea serului la 56^o anuleaza activitatea citotropa a IgE.

Rolul fiziologic principal al IgE pare a fi acela de protectie a

situsurilor anatomice expuse traumatismelor si patrunderii agentilor patogeni. IgE recruteaza factorii plasmatici si celulele efectoare, stimulând reactia inflamatorie acuta.

IgE ar fi unul din efectorii mecanismelor de îndepartare a parazitilor intestinali. Actiunea sa s-ar exercita prin efectul chimiotactic pozitiv fata de eozinofile, în focarul de parazitoza si prin stimularea contractiilor rapide si prelungite a musculaturii netede. IgE mareste permeabilitatea vasculara si permite anticorpilor serici si celulelor eozinofile sa penetreze mucoasa si sa participe la reactiile de aparare. Eozinofilele elibereaza continutul enzimatic al lizosomilor si produc liza parazitului.

IgE este declansatoare a reactiilor de hipersensibilitate imediata de tip *anafilactic*. In reactiile de hipersensibilitate imediata, mastocitele si bazofilele care leaga IgE se activeaza. Activarea ar fi rezultatul formarii unor punti antigenice între moleculele de IgE adiacente, care leaga un antigen(alergen) multivalent. Moleculele de IgE conectate prin puntea antigenica genereaza semnalul activarii celulare, a carei consecinta este eliberarea moleculelor vasoactive (histamina, serotonina, ECF, SRSA).

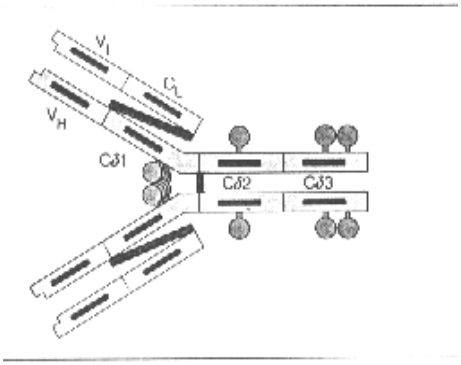


Fig. 22. *Structura* IgD umana. Schema ilustreaza pozitia puntilor disulfurice inter- si intracatenare, precum si pozitia ipotetica

a catenelor oligozaharidice.

IgD

IgD s-a descoperit în 1965 ca o proteina de mielom, cu proprietati speciale, care nu are specificitate antigenica a IgG, IgA sau IgM, dar precipita cu anticorpii specifici fata de catenele L ale imunoglobulinelor si este alcatuita din cele 4 catene. Ulterior IgD s-a identificat în serul

uman normal, dar si la toate speciile de mamifere si pasari.

IgD se gaseste în sânge, în cantitate foarte mica (0,2% din cantitatea totala de imunoglobuline).

Molecula de IgD este monomera. Lanturile L sunt în special de tip λ, iar catenele H au specificitate antigenica δ. Lantul H are 4 domenii: 3 în regiunea constanta si unul în regiunea variabila. Regiunea balama este foarte extinsa si este sensibila la actiunea proteazelor.

Functii. Aproape toata cantitatea de IgD are rol de *receptor de antigen*, împreuna cu IgM, pe suprafata majoritatii limfocitelor B mature. Moleculele membranare au un domeniu transmembranar si o scurta extensie citoplasmatica, analoga formei membranare a catenei μ. Cele doua izotipuri membranare (δ si μ) au acelasi tip de catena L, iar situsul lor de legare este identic, adica recunosc acelasi epitop. Nu exista molecule hibride μ/δ, deoarece cele doua catene H nu se împerecheaza. Raportul dintre cele doua izotipuri de pe suprafata limfocitelor B este variabil si semnificatia functionala a acestui raport nu se cunoaste.

IgD scade pe suprafata limfocitelor B de memorie si dispare complet pe masura ce celulele se diferentiaza spre plasmocit.

IgD seric are o concentratie de 3-40 μg/ml, fiind produs de un numar mic de plasmocite splenice si tonsilare. Sinteza într-un numar mic de celule si timpul de înjumatatire scurt (de 2,8 zile) explica nivelul seric scazut al IgD. Numarul mic de plasmocite producatoare de IgD explica raritatea mieloamelor producatoare de IgD. Dupa stimularea antigenica repetata nu se sintetizeaza anticorpi ai izotipului IgD. IgD nu are functie de anticorp efector. Dupa stimularea limfocitelor B care au ca receptor de suprafata molecule de IgD, diferentierea nu urmeaza o cale din care sa rezulte celule angajate în secretia de IgD. La pacientii cu deficit al sintezei de IgA, în glandele lacrimale, în parotide si în glandele nazale, plasmocitele producatoare de IgA sunt înlocuite cu cele producatoare de IgD, iar în mucoasa intestinala, cu cele care sintetizeaza IgG si IgM. Totusi, IgD nu este o imunoglobulina caracteristica secretiilor, deoarece în secretii nu este mai concentrata decât în ser.

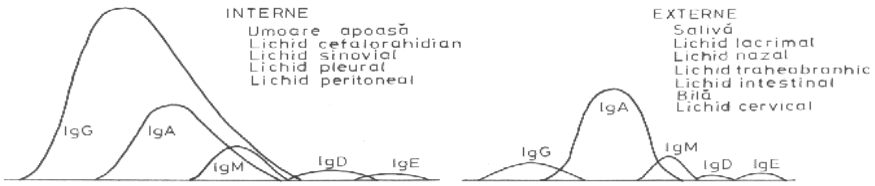


Fig. 23. Reprezentarea grafica a distributiei cantitative a diferitelor *clase de imunoglobuline* în umorile interne si externe.

Interactiuni antigen-anticorp

Reactiile Ag-Ac sunt consecinta proprietatii esentiale a imunoglobulinelor, aceea a *specificitatii de legare* cu determinantul antigenic care a indus sinteza lor.

Cele mai multe date referitoare la natura interactiunii s-au obtinut în reactia dintre anticorpii specifici fata de haptene si epitopul haptenei. Haptenele au avantajul ca, teoretic, prezinta un singur epitop.

Reactia Ag-Ac poate fi considerata ca prototip al interactiunilor macromoleculare, dar se deosebeste de interactia enzima-substrat prin doua caracteristici:

– reactiile Ag-Ac, *in vivo*, sunt totdeauna reversibile, deoarece anticorpii nu altereaza ireversibil antigenul, asa cum o enzima modifica substratul ei;

– heterogenitatea anticorpilor nu are echivalenta la alte categorii de proteine.

Reactiile Ag-Ac pot fi clasificate, dupa efectele pe care le produc: *reactii primare, secundare si tertiare.*

Reactiile *primare* semnifica recunoasterea specifica si legarea celor doi reactanti. Reactiile primare se studiaza prin metoda dializei la echilibru, a imunofluorescentei, RIA.

Reactiile *secundare* pot sa apara *in vitro*, ca o consecinta directa, dar nu obligatorie, a interactiunii primare. Ele se evidentiaza în timp prin fenomene de aglutinare sau de precipitare, în functie de natura antigenului.

Reactiile *tertiare* exteriorizeaza consecintele biologice ale reactiilor primare *in vivo*. Ele au un caracter complex, deoarece sunt influentate de factorii organismului: de concentratia complementului, de mediatorii eliberati de alte celule (mastocite), de afinitatea receptorilor de antigen. Reactiile tertiare pot fi protectoare, daca au ca efect imobilizarea bacteriilor, neutralizarea toxinelor si a virusurilor sau pot avea efecte nocive: soc anafilactic, anafilaxie locala, hemoliza intravasculara.

Bazele moleculare ale interactiunii Ag-Ac

Interactiunile Ag-Ac, *in vivo* sunt totdeauna reversibile. Factorii care conditioneaza interactiunea Ag-Ac sunt:

– *complementaritatea structurala* dintre determinantul antigenic si situsul de combinare al anticorpului. Acesta este factorul exclusiv al specificitatii reactiei. Complementaritatea structurala presupune adaptarea conformationala a celor doua grupari reactante si a fost gândita în termeni structurali, pe principiul cheie-broasca;

– *complementaritatea electrochimica* a gruparilor reactante este consecinta complementaritatii structurale si semnifica intrarea în actiune a unor forte intermoleculare care stabilizeaza si consolideaza interactiunea celor doua grupari. Formarea legaturilor intermoleculare necesita existenta unor grupari atomice suficient de apropiate pe cele doua molecule. Distanta dintre ele este invers proportionala gradului de complementaritate.

Desi complementaritatea structurala stricta nu este obligatorie, o potrivire spatiala cât mai înalta este mai favorabila interactiunii. Ea se exprima prin congruenta suprafetelor de contact care furnizeaza forte de atractie intermoleculara ce stabilizeaza complexul.

La interactiunea Ag-Ac participa urmatoarele tipuri de legaturi necovalente: *legaturile de H, fortele electrostatice, legaturi van der Waals* si *legaturi hidrofobe*. Toate sunt forte nespecifice cu valoare mica si natura lor face ca reactia sa fie reversibila.

Legaturile de H se formeaza când doi atomi au în comun un nucleu atomic de H (un proton). Protonul comun se gaseste între doi atomi de N sau de O sau între unul de N si unul de O. Nucleul de H este legat covalent de unul dintre cei doi atomi (de N sau de O). Legatura de H are energia de legare de 3-7 kcal/mol.

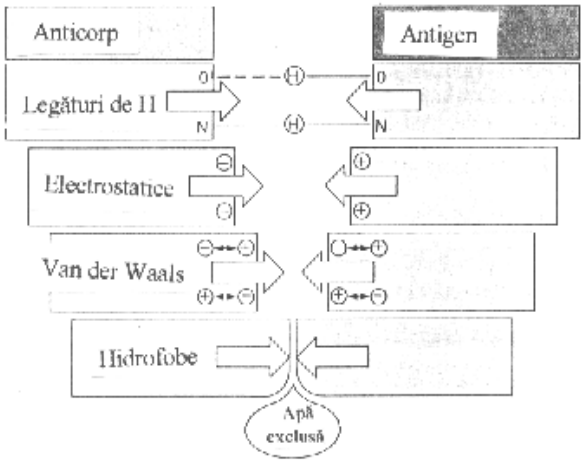


Fig. 24. *Fortele* intermoleculare implicate în formarea complexului Ag-Ac. Actiunea acestor forte necesita un contact strâns între cele doua grupari reactante. *Legaturile de H* rezulta prin formarea unei punti de H între doi atomi apropiati. *Fortele electrostatice* se datoreaza atractiei grupelor ionice cu sarcini opuse situate la periferia celor doua lanturi proteice. *Fortele Van der Waals* rezulta prin interactiunea între diferiti nori electronici, reprezentati sub forma dipolilor oscilanti. *Legaturile hidrofobe*, care pot contribui cu jumatate din forta de legare Ag-Ac, sunt produse prin asociatia gruparilor nepolare si hidrofobe, de unde moleculele de apa sunt excluse. Distanta optima între gruparile reactive variaza cu tipul de legatura.

Fortele electro-statice (coulombiene sau ionice) sunt rezul-tatul atractiei dintre atomi sau dintre grupe de atomi cu sarcina electrica opusa, situate pe cele doua grupari reactante: de exemplu, între un cation (Na^+) si un anion (Cl^-) sau între COO^- si NH_3^+. Energia de legare a acestor forte este semnificativa la distante foarte mici (sub 100 A^o) dintre gruparile reactante. Jux-tapunerea exacta a ionilor favorizeaza ac-tiunea acestor forte. Energia de legare este de 5 kcal/mol si variaza invers pro-portional cu patratul distantei dintre cele doua grupari reactante ($1/d^2$).

Legaturile van der Waals, cele mai slabe forte de interactiune, sunt active pe distante foarte mici dintre gruparile reactante. Energia de legare este de 1-2 kcal/mol. Legaturile van der Waals nu se bazeaza pe o separare permanenta a sarcinilor electrice, ci pe fluctuatii ale acestora, induse de apropierea moleculelor. La o distanta intermoleculara limita se formeaza câmpuri electrice instantanee, cu efect polarizant asupra moleculelor învecinate. Intre atomii suficient de apropiati, apare o forta de atractie reciproca indusa de sarcina dipol

fluctuanta, pe care un dipol o induce în dipolul învecinat. Aceste forte se mai numesc si *forte de dispersie*. Intensitatea lor depinde de distanta dintre gruparile implicate si este invers proportionala cu puterea a 7-a a distantei. Valoarea lor este optima la 1-2 Å.

Legaturile hidrofobe (sau apolare) apar între grupari nepolare (neionizate) în solutii apoase si sunt consecinta tendintei de excludere a retelei ordonate de molecule de apa, dintre molecula de antigen si cea de anticorp. Aceste legaturi sunt favorizate de aminoacizii cu grupari apolare, care au tendinta de asociere, diminuând numarul moleculelor de apa din vecinatatea lor. Prin eliminarea moleculelor de apa dintre gruparile reactante, distanta dintre situsurile active scade foarte mult si creste valoarea fortelor stabilizatoare.

Complementaritatea spatiala sau fortele intermoleculare nu sunt, fiecare în parte, suficiente pentru a forma legaturi stabile. Pentru stabilitatea interactiunii Ag-Ac sunt necesare ambele conditii. Cu cât energia de legare a reactantilor este mai mare, cu atât complexele Ag-Ac sunt mai stabile,

Interactiunea gruparilor reactante ale antigenului si anticorpului este definita de doi parametri: *afinitatea si aviditatea anticorpilor*.

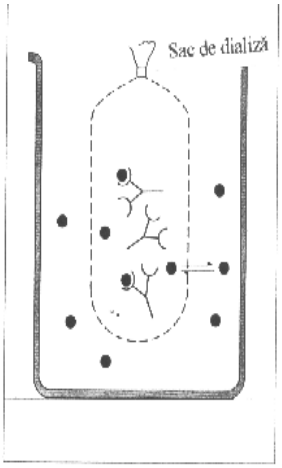


Fig. 25. Masurarea *afinitatii* anticorpilor prin *dializa la echilibru*. Interactiunea Ag-Ac este reversibila. In interiorul sacului de dializa, haptena este partial sub forma libera si partial legata cu anticorpii, în functie de afinitatea anticorpilor. Prin membrana sacului de dializa poate difuza numai haptena libera si con-centratia sa externa va egala concentratia haptenei libere din interiorul sacului. Masu-rarea concentratiei haptenei în sacul de dializa permite calculul cantitatii de haptena legata de anticorpi. Reînoirea constanta a tamponului duce la disocierea totala si la pierderea haptenei din sacul de dializa, ceea ce denota natura reversibila a legaturii Ag-Ac (dupa Roitt, 1997).

Afinitatea anticorpilor masoara *forta de legare* dintre un determinant antigenic si situsul complementar de legare al unui anticorp specific. Afinitatea este rezultanta fortelor de atractie si de respingere, care mediaza interactiunea celor doi reactanti. Forta acestor interactiuni se masoara în reactia dintre un antigen monovalent (a unei haptene) cu anticorpii specifici. O interactiune cu afinitate înalta presupune structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea imperfecta a gruparilor reactante determina o afinitate scazuta, deoarece fortele de atractie sunt active numai pe distante foarte mici si sunt diminuate de fortele de respingere.

Metoda de masurare a afinitatii anticorpilor este *dializa la echilibru*. Metoda se bazeaza pe proprietatea *haptenelor mici*, monovalente (care nu dau reactii de precipitare cu anticorpii specifici), de a traversa membrana de dializa, impermeabila pentru anticorpi, ca si pentru complexele haptena-anticorpi.

Solutia concentrata de anticorpi se repartizeaza într-un sac de dializa si se imerseaza într-un volum cunoscut de solutie tampon, la pH 7,4, ce contine o concentratie cunoscuta a haptenei. Haptena libera difuzeaza prin membrana, în compartimentul cu anticorpi si se combina partial cu acestia. La echilibru, se masoara concentratia haptenei libere la exterior, egala cu concentratia haptenei libere din interior. Concentratia totala a haptenei în sacul de dializa este mai mare, deoarece o proportie a moleculelor sale este legata de anticorpi.

Diferenta dintre concentratia initiala si cea finala a haptenei, în compartimentul exterior, masoara afinitatea ei de legare cu anticorpii specifici, în conditiile unui *exces* de molecule haptenice, care favorizeaza disocierea complexelor antigen-anticorp.

Aviditatea este un parametru al interactiunii Ag-Ac, care rezulta din multivalenta antigenului. Cele mai multe antigene poseda mai mult decât un determinant antigenic. De exemplu, celulele bacteriene sau virionii, dar si polizaharidele, au pe suprafata un numar mare de determinanti antigenici repetitivi. Antigenele proteice au totdeauna determinanti antigenici multipli, dar diferiti.

Antigenele multivalente leaga un numar echivalent de molecule de anticorpi. Energia totala de legare a epitopilor multipli ai unui antigen, cu situsurile anticorpilor specifici este mult superioara comparativ cu energia separata a fiecarei interactiuni dintre situsul de combinare si epitop. Aviditatea caracterizeaza energia medie de legare a unui antigen multivalent cu anticorpii specifici si masoara forta rezultanta a afinitatii dintre epitopii multipli ai unui antigen si paratopii complementari. Complexele Ag-Ac formate de antigenele multivalente sunt stabile,

disocierea lor fiind dificila, deoarece este necesara ruperea tuturor legaturilor existente.

Afinitatea furnizeaza date cu privire la natura fizico-chimica a reactiei Ag-Ac, iar aviditatea este semnificativa pentru antigenele naturale multivalente.

Afinitatea si aviditatea conditioneaza proprietatile fiziologice ale anticorpilor. Cei cu afinitate mare sunt mai eficienti în reactiile biologice: în protectia antibacteriana si antivirala, în reactia de precipitare *in vitro*.

Complexele Ag-Ac formate de anticorpi cu afinitate mica, persista în circulatie si se depun pe membrana bazala a glomerulilor renali. Complexele formate de anticorpii cu afinitate mare se elimina rapid din circulatie, fara efecte defavorabile asupra functiei renale.

Interactiunea Ag-Ac este caracterizata permanent prin formarea si anularea diferitelor tipuri de legaturi intermoleculare. *In vivo*, probabil toate reactiile Ag-Ac sunt reversibile, dar reactiile secundare, *in vitro* (aglutinarea, precipitarea), în conditiile echilibrului reactantilor, sunt ireversibile.

Bazele moleculare ale reactiilor imune încrucisate

Trasatura dominanta a reactiilor Ag-Ac este *specificitatea*, derivata din însasi caracterul raspunsului imun. In general, anticorpii reactioneaza numai cu antigenul *homolog*, adica antigenul inductor al sintezei lor, dar exista si exceptii, când anticorpii unui ser imun reactioneaza si cu antigene *heterologe*, adica altele decât cel folosit la imunizare, dar înrudite chimic cu acesta.

Molecula de imunoglobulina, cu o structura tridimensionala unica, poate sa lege un numar de determinanti antigenici diferiti, similari ca structura chimica cu antigenul inductor sau cu o structura chimica distincta, daca epitopul sau se potriveste spatial, cel putin cu o zona limitata a situsului de combinare al anticorpului.

Energia interactiunii anticorpului cu antigenele heterologe este totdeauna mai mica. *Posibilitatea ca o molecula de anticorp sa interactioneze cu antigene heterologe sta la baza multispecificitatii imunoglobulinelor sub aspect molecular si a reactiilor încrucisate sub aspect serologic.*

Din punct de vedere molecular, posibilitatea legarii unor epitopi diferiti, cu un anticorp unic în ceea ce priveste situsul sau de combinare, se explica prin faptul ca la nivelul subunitatilor sale structurale, se leaga epitopi diferiti, cu dimensiuni mai mici si configuratie complementara

acestora.

Capacitatea unui situs de combinare al unei molecule de anticorp, de a lega doua antigene diferite, corespunde *reactivitatii serologice încrucisate adevarate*. Legarea epitopilor heterologi se face totdeauna cu afinitate mai mica. Pentru antigenele proteice, reactivitatea încrucisata este determinata de existenta unor epitopi asemanatori din punct de vedere spatial, cu mici diferente ale secventei de aminoacizi, care induc usoare modificari ale epitopilor. *Esenta reactivitatii încrucisate adevarate este ca situsul moleculei de anticorp leaga epitopi diferiti.*

O alta cauza de ordin molecular a reactiilor încrucisate o constituie *heterogenitatea configuratiei spatiale a situsului de combinare* al moleculelor de anticorpi ale unui ser imun. Heterogenitatea anticorpilor este consecinta faptului ca nu exista nici un antigen care sa aiba un singur epitop. Cea mai simpla haptena poate induce sinteza câtorva specificitati de combinare a anticorpilor. Heterogenitatea specificitatii de combinare a anticorpilor unui ser imun, mareste sansa unei reactii cu antigene heterologe.

Din punct de vedere serologic, capacitatea anticorpilor unui ser imun, cu diferite specificitati de legare, de a reactiona imunologic cu antigene heterologe se numeste *reactivitate încrucisata de tip II* si reflecta capacitatea unei subpopulatii a anticorpilor serici de a lega un antigen heterolog.

Exemple de reactii imune încrucisate

Reactiile imune încrucisate au fost initial detectate pentru serurile imune fata de celulele bacteriene, datorita complexitatii antigenice a acestora. Orice celula bacteriana contine un numar mare de antigene distincte (flagelare, somatice, capsulare, piliare, fimbriale, etc.). Serul imun specific contine anticorpi (în diferite proportii) fata de toate categoriile de antigene celulare, unele fiind comune mai multor linii bacteriene.

La rândul lor, moleculele mari contin numerosi determinanti antigenici, unii dintre ei putând fi comuni moleculelor omologe ale diferitelor specii.

Reactiile încrucisate sunt mai frecvente pentru antigenele care au epitopi de natura glucidica, deoarece glucidele realizeaza polimeri cu configuratii spatiale limitate ca diversitate.

Antigenele *heterofile* de tip Forssman, de natura polizaharidica, cu o larga distributie în lumea vie (om, animale, plante, microorganisme), se caracterizeaza prin capacitatea lor de a reactiona cu un ser imun

specific fata de unul din antigenele grupului.

Antigenele *proteice* din surse taxonomice înrudite, dau frecvent reactii încrucisate. De exemplu, antiserul fata de albumina de ou de gaina, precipita albumina din oul de rata; albumina serica bovina si cea equina sau fibrinogenul uman si cel bovin reactioneaza încrucisat cu serul imun obtinut fata de una din aceste proteine. Anticorpii anti-Hbg de cal, sintetizati de iepure, reactioneaza nu numai cu antigenul specific, dar si cu Hbg a unor specii înrudite: zebra, vaca, porcul, însa reactioneaza foarte putin cu Hbg de rozatoare, de pasari, de amfibieni.

Reactia Ag-Ac a fost un instrument util pentru determinarea diferentelor structurale dintre proteinele omologe, care constau în secventa aminoacizilor. Cu cât doua specii de organisme sunt mai apropiate filogenetic, cu atât proteinele lor omologe sunt mai asemanatoare si dau reactii încrucisate mai intense.

Capacitatea antigenelor distincte, dar înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reactioneaza încrucisat, a creat complicatii în tratamentul bolnavilor cu diabet insulino-dependent. Insulina de origine animala (porcina, bovina, ovina), asemanatoare cu cea umana, a determinat la unii pacienti aflati sub tratament de lunga durata, sinteza anticorpilor anti-insulina, datorita micilor deosebiri ale secventei aminoacizilor din pozitiile 8, 9, 10. Anticorpii specifici fata de insulina unei specii, reactioneaza cu insulina celorlalte specii.

		8	9	10
	bovina	Ala	Ser	Val
Insulina	oaie	Ala	Gly	Val
	cal	Thr	Gly	Ileu
	porc	Thr	Ser	Ileu

Alta complicatie a derivat din utilizarea preparatelor de insulina, contaminate cu proinsulina. Insulina este sintetizata în celulele B ale insulelor Langerhans, ca *preproinsulina*, care se deosebeste de proinsulina printr-o secventa de 20 de aminoacizi la capatul N. Dupa scindarea acestei secvente ramâne *proinsulina*, la care aminoacidul 1 din catena A si aminoacidul 30 din catena B, sunt legati prin catena C (33 aminoacizi). Peptidul C are rol în formarea puntilor S-S între catenele A (21 aminoacizi) si B (30 aminoacizi).

Injectarea preparatelor de proinsulina determina formarea autoanticorpilor anti-insulina. Eliberarea proinsulinei în organism prin liza celulelor insulare B are acelasi efect.

Reactiile imune încrucisate reciproce sunt frecvente, dar nu

obligatorii. De exemplu, serul imun de iepure anti-albumina serica bovina precipita ovalbumina, dar reactia reciproca nu are loc.

Reactii încrucisate între antigene microbiene si tisulare. Serul imun anti-polizaharid capsular de *Str. pneumoniae* aglutineaza eritrocitele umane de grup A (a caror specificitate antigenica este conferita de N-acetil-galactozamina), iar serul imun anti *E. coli* aglutineaza eritrocitele umane de grup B (a caror specificitate antigenica este conferita de galactoza).

Serurile imune de la pacientii cu maladii infectioase reactioneaza cu antigenul microbian omolog, dar uneori, si cu antigene ale gazdei. O astfel de reactie este foarte interesanta, deoarece poate sta la originea intolerantei fata de self, dupa un proces infectios. Un exemplu este cazul anticorpilor ce apar la pacientii infectati cu *T. pallidum*, care se combina cu *cardiolipina*. Anticorpi reactivi fata de cardiolipina se gasesc de asemenea, în serul pacientilor infectati cu *M. leprae* si la cei cu lupus eritematos sistemic. Cardiolipina libera în circulatie nu este imunogena, dar devine imunogena dupa asocierea cu învelisul extern de *T. pallidum*, ceea ce explica sinteza anticorpilor la cei infectati, dar lipseste în celulele de *M. leprae*.

Reactivitatea încrucisata a stat la baza explicatiei reactiilor autoimune care se produc între antigene ale muschiului cardiac sau antigene valvulare si anticorpii anti-proteina M de *Str. haemoliticus*.

Capitolul 3

SISTEMUL IMUNITAR

Existenta tuturor organismelor vii este conditionata de activitatea unor mecanisme de rezistenta si de imunitate, capabile sa protejeze individualitatea lor chimica, prin mecanisme de recunoastere si diferentiere a substantelor proprii (self) de cele straine (nonself). In mod normal, aceste mecanisme sunt perfect tolerante fata de moleculele self, dar se activeaza si reactioneaza mai mult sau mai putin viguros pentru a îndeparta, a neutraliza sau a distruge substantele nonself.

Mecanismele de rezistenta si imunitate sunt prezente pe toata scara evolutiva a organismelor, începând cu bacteriile si se complexeaza în evolutie.

Celulele bacteriene poseda mecanisme de protectie a individualitatii genetice, reprezentate de:

– *fenomenele de restrictie* mediate de prezenta unor sisteme enzimatice specifice (enzime de restrictie), care recunosc moleculele straine de ADN, le cliveaza la nivelul unor situsuri specifice, rezultând fragmente mai mici, sensibile la actiunea exo- si endonucleazelor;

– fenomenele de *reparatie genetica* dependente de activitatea unor sisteme enzimatice care recunosc modificarile ADN induse de mutatii sau de lipsa de fidelitate a mecanismelor de replicare, transcriere si traducere genetica, corectându-le fie complet (sistemele error free) sau minimalizând erorile în cazul sistemelor reparatorii predispuse la erori (error prone systems).

La *plantele superioare*, mijloacele de aparare specifica, aparent sunt absente, dar exista o gama larga de modalitati de aparare nespecifica:

– continuitatea si integritatea tesuturilor epidermice, acoperite sau impregnate cu substante impermeabile pentru virusuri si microorganisme;

– rezistenta fiziologica conferita de continutul înalt de zaharuri

reducatoare, prezenta taninurilor, a diferitilor acizi organici, a pseudoanticorpilor cu activitate hemaglutinanta în sucurile vegetale.

La *protozoare*, procesele de recunoastere asigura selectia hranei, identificarea partenerilor pentru conjugare la parameci, iar la cele parazite, procesele de recunoastere mediaza interactiunea cu gazda.

Mecanisme de aparare la nevertebrate

Desi nu au sistem limfoid, nevertebratele recunosc si raspund la substantele nonself, la fel de eficient ca si vertebratele. La ele functioneaza o diversitate de mecanisme, unele fiind *inductibile*. Raspunsul este de scurta durata si nu are specificitate fata de agentul infectios patogen. Raspunsul imun al nevertebratelor se aseamana calitativ cu cel înascut al vertebratelor mediat de celulele fagocitare si de moleculele neimunoglobulinice.

La nevertebrate, apararea organismului este asigurata de bariere fizico-chimice complexe: *secretia mucoasa* care acopera corpul celenteratelor, anelidelor, molustelor si protocordatelor, omoara potentialii patogeni. Exoscheletul dur al celenteratelor, molustelor, artropodelor, echinodermelor si protocordatelor, formeaza o bariera protectoare eficace fata de agentii infectiosi. Majoritatea nevertebratelor superioare au sistem circulator cu celule albe, denumite *hemocite* sau *celomocite*, în functie de natura cavitatii corpului. Lipsesc hematiile.

În mediul intern al nevertebratelor se gasesc fagocite, factori antimicrobieni constitutivi si inductibili cu efect neutralizant si litic, factori de coagulare a macromoleculelor straine. Toate nevertebratele, chiar cele care nu au cavitati ale corpului (spongieri, anemone, viermi lati), au fagocite, uneori de mai multe tipuri. Ca si la vertebrate, fagocitele sunt efectorii raspunsului inflamator, sintetizeaza enzime lizosomale si poseda mecanisme citocide dependente de superoxid.

Reactiile de aparare (repararea tisulara, fagocitoza, reactia de încapsulare)sunt mediate de fagocite si de celulele hemostatice. Ingestia microorganismelor invadatoare este rezultatul actiunii fagocitelor, iar un numar mare de microorganisme si de metazoare parazite este încapsulat de celulele hemostatice si de tip fagocitar. Endoparazitul care patrunde în organismul nevertebratelor este fagocitat, sau daca are dimensiuni prea mari, este încapsulat. Incapsularea este rezultatul unei fagocitoze fruste. Adeseori, endoparazitul încapsulat, este omorât sub actiunea intermediarilor toxici

ai unei cascade enzimatice.

La nevertebrate lipsesc limfocitele si moleculele de imunoglobuline, dar acestea sunt compensate de o varietate de factori umorali de aparare: aglutinine, lizozim, bactericidine, enzime lizosomale, factori de imobilizare. La insecte s-au detectat peste 15 tipuri de proteine antibacteriene inductibile în câteva ore dupa injectarea unui antigen.

Nevertebratele nu au proteinele cascadei complementare, dar viermii, insectele, crustaceii contin sistemul *profenoloxidazei*. Componentele acestui sistem sunt activate de o serie de enzime. La capatul cascadei de activare se formeaza enzima activa *fenoloxidaza*, cu rol esential în îndepartarea substantelor nonself.

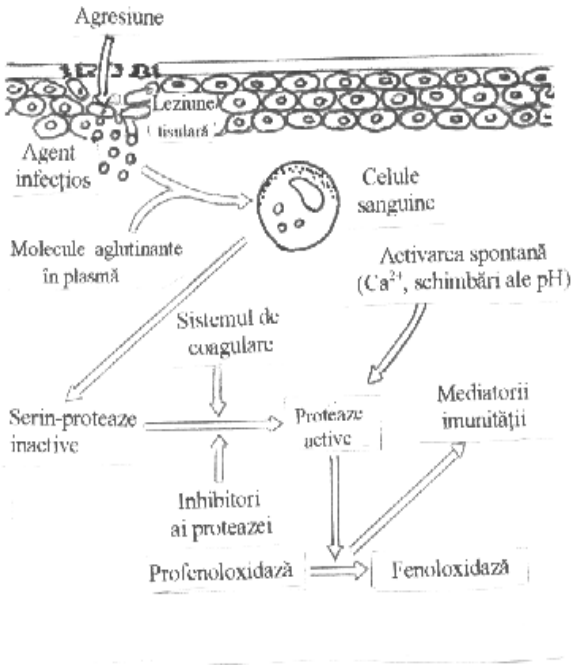


Fig. 26. Un mecanism posibil de *activare a profenoloxidazei* la *fenoloxidaza,* la artropode. Activarea este stimulata de leziunile tisulare, de infectia cu microorganisme, de schimbari ale concentratiei ionilor de Ca^{2+} si ale valorii pH, care pot duce la coagularea plasmei si generarea factorilor care mediaza evenimentele ulterioare ale imunitatii (dupa Roitt, 1997).

Fagocitoza este foarte activa si este stimulata de aglutininele si bactericidinele cu rol de opsonine. Din punct de vedere functional, aglutininele si bactericidinele sunt similare anticorpilor. Acestea sunt lectine, cu rolul de a lega componenta glucidica a glicoproteinelor de pe

suprafata celulelor nonself, rezultatul fiind aglutinarea.

Lectinele sunt molecule care au aparut timpuriu în evolutie si sunt ubicvitare: se gasesc la bacterii, plante, nevertebrate si vertebrate. Ele tapeteaza microorganismele invadatoare si au rolul de a le imobiliza, dar au si rol opsonizant, usurând fagocitoza. In functie de specificitatea lor de legare cu glucidele, lectinele sunt foarte diferite.

În corpul gras al insectelor superioare s-au caracterizat circa 100 de peptide antimicrobiene, a caror sinteza rapida este indusa de infectie. Din punct de vedere structural sunt de doua tipuri:

– peptide ciclice, care contin punti S-S (de exemplu, drosmycina), active fata de bacteriile Gram pozitive si fata de fungi;

– peptide lineare (cecropine bogate în Gly si Pro), active fata de bacteriile Gram negative.

Componentele celulare si humorale cu functii protectoare mediaza reactii de aparare nespecifice (înascute), fara raspuns accelerat la stimularea antigenica secundara.

ORGANIZAREA SISTEMULUI IMUNITAR LA VERTEBRATE

La vertebrate, apararea este asigurata de mecanisme complicate celulare si humorale, de rezistenta si imunitate. Functia esentiala a sistemelor de aparare este protectia fata de agentii patogeni invadatori. Interactiunea permanenta cu microorganismele are un rol hotarâtor în dobândirea complexitatii structurale si functionale a sistemului imunitar. Dovada o constituie faptul ca la animalele germ-free (axenice), numarul limfocitelor B si titrul anticorpilor serici naturali sunt de 5-10 ori mai mici decât la organismele conventionale. Evolutia a generat tipuri celulare specializate, tot mai eficiente functional, care neutralizeaza, sechestreaza, omoara sau îndeparteaza agentii infectiosi.

La vertebrate, reactiile de aparare sunt rezultatul actiunii unor *factori humorali nespecifici* (complement, substante bactericide) si *specifici* (anticorpi) si a unor *populatii de celule* specializate, *cu actiune nespecifica* (fagocite) sau *specifica* (limfocite).

Din punct de vedere structural, în conceptia moderna, sistemul imunitar al organismelor superioare este considerat ca *un organ difuz* sui-generis, alcatuit dintr-un numar foarte mare de molecule si celule, reunite într-o retea de interactiuni complexe, a carei functie este asigurarea integritatii si individualitatii structurale a organismului.

În conceptia restrictiva a lui N.K. Jerne, sistemul imunitar este reprezentat în exclusivitate de *limfocite*, iar într-o acceptiune mai larga, pe lânga limfocite, în alcatuirea sistemului imunitar intra o serie de celule accesorii cu rol esential în declansarea raspunsului imun: *macrofagele* si o serie de *celule înrudite*(celulele Lagerhans din tegument, celulele dendritice si cele interdigitate).

Se apreciaza ca numarul limfocitelor, la adultul normal, este de 10^{12}, iar al moleculelor de imunoglobuline, de ordinul a 10^{20}. Impreuna, aceste componente formeaza *organul difuz*, cu greutatea de circa 910 g (1-2% din greutatea corpului), a carui existenta este adeseori ignorata, datorita caracterului sau difuz, în tot organismul. Celulele si moleculele sistemului imunitar sunt prezente în toate tesuturile, dar în unele organe (splina, ganglioni limfatici, placi Peyer, amigdale, timus), componentele celulare au o densitate maxima.

Sistemul imunitar este unul din cele mai complexe ale organismului. Complexitatea lui deriva din structura de *retea* complicata de comunicatii intercelulare, din ubicvitatea sa în organism si din efectele multiple pe care le determina un numar mic de categorii celulare. Sistemul imunitar este considerat un adevarat “creier mobil”.

Din punct de vedere structural si functional, sistemul de aparare al organismelor superioare prezinta numeroase dualitati:

– existenta unui compartiment *al rezistentei nespecifice si neadaptative* (înascuta) si a unui compartiment cu *actiune specifica si adaptativa* (sistemul imunitar);

– prezenta a *doua populatii* înclinate de limfocite (T si B), care mediaza *imunitatea celulara* si respectiv *humorala;*

– activitatea limfocitelor este modulata fie *stimulator*, fie *inhibitor*, sub actiunea unor celule si a unor factori humorali;

– existenta *organelor limfoide centrale* (primare) si *periferice* (secundare);

– existenta unui raspuns *imun primar* si a unui *raspuns imun secundar*;

– *dualitatea structurala* (doua perechi de catene polipeptidice) si functionala (bivalenta) a moleculei de anticorp;

– *comportamentul dublu* al moleculei de anticorp: molecula de anticorp recunoaste epitopul specific si la rândul ei este recunoscuta de molecule cu rol receptor.

Numarul celulelor sistemului imunitar (cu un ordin de marime superior neuronilor) si al moleculelor sale nu reflecta fidel potentialul de aparare a organismului, deoarece în cursul raspunsului imun are loc proliferarea si amplificarea numerica a limfocitelor, precum si a potentialului de biosinteza. La aceasta se adauga o rata înalta de

reînoire si refacere a rezervelor sale celulare.

La om se produc zilnic un miliard de limfocite ce trec în circulatie. Circulând si recirculând prin reteaua vaselor sanguine si limfatice, celulele si moleculele sistemului imunitar asigura supravegherea organismului, recunoasterea moleculelor si a celulelor nonself, pentru a le elimina.

Limfocitele

Sistemul imunitar este reprezentat de tesuturi derivate din mezoderm, a caror principala componenta celulara este *limfocitul*. De aici deriva denumirea de *sistem limfoid*. In ultimul timp se foloseste denumirea de "limfon", care semnifica totalitatea organelor limfoide – primare si secundare, precum si celulele componente cu functia de a recunoaste antigenul.

Limfocitele sunt celule care în cursul elaborarii raspunsului imun, recunosc specific antigenul si de aceea se mai numesc *imunocite*. De aici deriva denumirea de *sistem imunocitar*, echivalenta celei de sistem limfoid. Toate celulele acestui sistem poarta pe suprafata lor, molecule cu rol receptor, capabile sa recunoasca specific determinantii antigenici straini.

Sistemul imunitar functioneaza pe baza interactiunii dintre semnal (antigen) si receptorul specific limfocitar preformat.

În conceptia moderna, *limfocitul* este celula centrala a sistemului imunitar. Ea nu este celula "cap de serie" – asa cum o considerau vechii histologi, ci prezinta o extraordinara capacitate de reactivitate si diferentiere.

Numarul limfocitelor. Copiii au un numar mai mare de limfocite si de aceea vârsta trebuie considerata ca un parametru fiziologic de variatie, în evaluarea numerica a acestor celule. Ele reprezinta 25-33% din totalul leucocitelor, adica circa 2100 celule/mm^3 de sânge. Valori mai mici de 1500 limfocite/mm^3 semnifica starea de *limfocitopenie* si cel mai adesea semnifica un deficit numeric al limfocitelor T.

Pâna în anii '50, limfocitele erau distinse numai dupa dimensiuni: mari, mijlocii si mici. Cele mai multe limfocite circulante au dimensiuni mici: 7-10 μm diametru. La microscopul optic, pe frotiul colorat May Grunwald – Giemsa, limfocitele se disting de celelalte dupa dimensiuni, sunt agranulare si au cel mai mare raport nucleocitoplasmatic. Limfocitele mari au un raport nucleocitoplasmatic mai mic si în citoplasma se gasesc granulatii azurofile. Se numesc *limfocite granulare*

mari (LGL). *In vitro*, limfocitele sunt neaderente si nu fagociteaza.

Astazi, Imunologia are la baza conceptul unei heterogenitati functionale nelimitate a limfocitelor, care deriva din diversitatea specificitatii receptorilor suprafetei lor.

Populatia de limfocite care are receptori identici de antigen si recunoaste un singur epitop (sau câtiva înruditi) formeaza *o clona*. Toate celulele unei clone sunt descendente ale unei singure celule-mama. In consecinta, în organism sunt tot atâtea clone de limfocite, câte tipuri de determinanti antigenici exista (teoretic) în natura. Corespondenta complementaritatii spatiale dintre receptorii limfocitari de antigene si epitopii antigenici asigura posibilitatea elaborarii unui raspuns imun specific, dupa contactul limfocitelor cu oricare dintre epitopi.

Caracterizarea functionala a limfocitelor este rezultatul cercetarilor întreprinse dupa anul 1960. În raport cu organul limfoid primar în care se produce diferentierea si maturarea, Roitt si col. (1966) au împartit limfocitele în doua categorii distincte;

– *limfocite T*, care se diferentiaza si se matureaza în timus;

– *limfocite B*, care se diferentiaza si se matureaza în bursa lui Fabricius la pasari si în echivalentii ei functionali, la mamifere.

În functie de capacitatea lor de a interactiona cu antigenul specific, limfocitele sunt:

– *incompetente* (imature), cele care nu recunosc antigenul;

– *competente* (mature), cele care recunosc antigenul specific.

Starea de competenta este conditionata de prezenta receptorilor prin intermediul carora antigenele sunt recunoscute. Pe suprafata unei celule pot fi pâna la 100 000 de molecule receptoare identice, care asteapta întâlnirea cu substantele nonself corespunzatoare.

Dupa ce limfocitul si-a dobândit competenta în unul din organele limfoide primare, poate sa ramâna în repaus, daca organismul nu a receptionat mesajul antigenic corespunzator. Aceste limfocite sunt *neangajate* (neinformate sau naive). Cele care au venit în contact cu antigenul specific sunt limfocite *angajate* (informate). Ele constituie substratul material al *memoriei imunologice* si ori de câte ori se vor reîntâlni cu antigenul, vor produce un raspuns imun rapid si amplu.

Dupa durata vietii, limfocitele sunt:

– cu *viata scurta* (efectoare ale raspunsului imun);

– cu *viata lunga* (de memorie). Ele recircula în organism perioade îndelungate (de ordinul anilor). La om, limfocitele de memorie ar supravietui circa 10 ani, fara sa se divida.

În raport cu functia pe care o îndeplinesc, se disting urmatoarele categorii de limfocite:

– *efectoare*, cele care direct sau indirect, prin molecule efectoare, neutralizeaza antigenul;

– *reglatoare*, cele care ralizeaza echilibrul optim al raspunsului imun.

Limfocitele B

Limfocitele B reprezinta 5-15% din totalul limfocitelor circulante si constituie o diviziune functionala majora a populatiei limfocitare. Impreuna cu descendentii lor diferentiati (limfoblastul, plasmocitul), limfocitele B sintetizeaza anticorpi, efectorii *raspunsului imun mediat humoral* (RIMH).

Limfocitul B imunocompetent (matur, neangajat) sintetizeaza cantitati mici de molecule ale unui izotip de imunoglobuline, care ramân legate de membrana limfocitului, având rol de receptori de antigen, adevarate “antene” de detectare a antigenului specific.

Sub aspectul specificitatii de legare a antigenului, fiecare organism poseda *milioane de clone* de limfocite B, adica mici populatii celulare identice, descendente din aceiasi celula mama, care recunosc si leaga acelasi antigen si produc anticorpi cu aceiasi configuratie spatiala a situsului de combinare.

Dupa activare, toti descendentii limfocitului B sintetizeaza imunoglobuline si le secreta ca anticorpi, cu aceiasi specificitate de legare pe care a avut-o receptorul.

Receptorul de antigen al limfocitelor B. Majoritatea limfocitelor B umane din sângele periferic exprima doua izotipuri de imunoglobuline pe suprafata lor: IgM si IgD sau numai IgD. Situsurile de legare ale celor doua izotipuri sunt identice. Numai 10% dintre limfocitele B au pe suprafata lor, ca receptor de antigen, molecule de IgG, IgA sau IgE. Cele care au ca receptor molecule de IgA, sunt localizate în tesutul limfoid asociat mucoaselor.

Moleculele receptoare de imunoglobulina sunt inclavate cu capatul

C-terminal în membrana. Intre IgM legat de membrana (IgMm), cu functia de receptor de antigen si IgM seric (IgMs), sunt doua deosebiri majore:

– IgMm contine o secventa C-terminala hidrofoba, prin care se

ancoreaza în membrana limfocitelor mature neangajate, care nu au venit în contact cu antigenul;

– IgMm este monomer, iar IgM seric este pentamer.

Secventa C-terminala a IgMm cuprinde 25 de aminoacizi hidrofobi ce formeaza domeniul transmembranar, urmat de o secventa cationica Lys-Val-Lys. Ca la toate proteinele ancorate în membrana, acest domeniu formeaza un α-helix, cu o lungime suficienta pentru a strabate membrana. Fiind hidrofoba, secventa de aminoacizi are interactiuni strânse cu lipidele membranei. Secventa cationica se extinde în citoplasma, marind gradul de stabilitate a moleculei în membrana celulara.

Dupa stimularea antigenica, sinteza se comuta la IgM seric. Trecerea de la IgMm la IgMs este rezultatul unor diferente ale modului de prelucrare a ARN premesager. Copia de ARN premesager pentru sinteza catenei μ(H) are doua situsuri potentiale de clivare si atasare a resturilor de poli-A, ce marcheaza capatul ARNm. Dupa stimularea antigenica, din ARN premesager sunt clivate secventele codificatoare ale domeniului C-terminal hidrofob si se sintetizeaza molecule de IgM fara secventa C-terminala de aminoacizi hidrofobi.

Comutarea IgMm --- IgMs nu modifica lantul L al moleculei. Cele doua forme ale IgM au domenii identice VH si VL, adica au aceiasi specificitate de legare a antigenului (au acelasi idiotip).

Limfocitul B are receptori membranari pentru substantele mitogene, pentru complement (C_3b), pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor, pentru insulina etc. Receptorul pentru C_3b functioneaza si ca receptor pentru virusul Epstein-Barr. Limfocitele B neactivate au receptori de mica afinitate pentru IL-2, dar dupa stimularea antigenica, ele exprima rapid, receptori pentru IL-2 de înalta afinitate. Limfocitele B raspund la efectul stimulator al IL-2, prin proliferare rapida si secretia IgM. Pe suprafata limfocitelor B se gasesc la densitate înalta, moleculele CMH II.

Limfocitele T

Limfocitele T reprezinta pâna la 80% din totalul limfocitelor circulante. Valorile normale în sânge, pentru limfocitele T sunt cuprinse între 1620-4320/mm^3, între una si 18 luni de viata si între 590-3090/mm^3, dupa 18 luni.

Proportia limfocitelor T se poate determina prin metoda rozetelor

cu hematii de berbec sau prin metoda imunofluorescentei cu anticorpi monoclonali fata de receptorul de antigen.

Limfocitele T mature exprima markerul CD_4** sau CD_8. Aceste molecule apartin suprafamiliei imunoglobulinelor. Celulele CD_4 au de obicei functie *helper*, iar cele ce exprima markerul CD_8 sunt *citotoxice*.

Limfocitele T îndeplinesc functii complexe, atât *efectoare* ale raspunsului imun mediat celular cât si *reglatoare*, prin intermediul unor factori humorali pe care-i secreta, denumiti *limfochine*. Limfocitele T realizeaza urmatoarele functii:

– lizeaza celulele care exprima molecule nonself pe suprafata lor;

– regleaza raspunsul imun;

– mediaza reactiile de hipersensibilitate întârziata.

Aceste functii sunt rezultatul heterogenitatii functionale si se datoreaza activarii unor subpopulatii distincte de limfocite T:

–*limfocite Tc* (Tcl, citotoxice sau citolitice) exprima pe suprafata lor markerul T_8 (CD_8);

–*limfocite Th* (helper) au pe suprafata markerul CD_4. Acestea sunt cele mai numeroase, reprezentând 60-65% din numarul total de limfocite T ale organismului uman;

–*limfocite Ts* (supresoare), purtatoare ale markerului CD_4;

–*limfocite* T_D sau T_{DH} (*d*elayed *h*ypersensitivity) exprima markerul CD_8.

Functiile limfocitelor Th se realizeaza prin intermediul limfochinelor secretate. In functie de limfochinele pe care le sintetizeaza, limfocitele Th se clasifica în doua subseturi:Th-1 si Th-2.

Celulele Th-1 (Th-c) secreta IFN gama, IL-2 si TNF beta (citochine de tip 1, stimulatoare ale imunitatii mediate celular). Citochinele de tip 1 produc urmatoarele efecte: stimuleaza reactia de citotoxicitate si inflamatorie asociata cu reactiile de hipersensibilitate întârziata. In esenta, limfocitele Th-1 au rol în edificarea unui *raspuns imun mediar celular* (RIMC).

Celulele Th-2 (Th-b) secreta citochine de tip 2: IL-4, IL-5, IL-6 si IL-10 (dar nu secreta Il-2) si stimuleaza activitatea limfocitelor B de memorie. Citochinele tip 2 (IL-4, IL-5) stimuleaza *raspunsul imun humoral* fata de parazitii extracelulari (stimuleaza diferentierea limfocitelor B spre plasmocit) si instalarea starilor alergice prin capacitatea lor de a induce sinteza IgE si de a stimula mastocitele. In esenta, limfocitele Th-2 sunt implicate în edificarea raspunsului imun mediat humoral (RIMH). Prin toate aceste efecte, limfocitele Th sunt amplificatoare ale raspunsului imun

Limfocitele CD_8 (T citototoxice) reprezinta 25-35% dintre

limfocitele T circulante. Functia lor consta în *efectul litic* prin contact celular direct asupra celulelor infectate cu virusuri, malignizate sau alogenice.

Limfocitele T_D sunt mediatoare ale reactiilor de *hipersensibilitate întârziata* (*d*elayed) de tip tuberculinic. Ele secreta limfochine cu efecte locale asupra macrofagelor si limfocitelor din focarul inflamator.

Limfocitele Ts sunt inhibitoare ale amplitudinii raspunsului imun, dupa epuizarea antigenului. Ele au rolul de a diminua intensitatea RIMC si RIMH, mentinând în limite fiziologice intensitatea reactiilor imunitare. Se pare ca îsi exercita rolul supresor asupra raspunsului imun, prin inhibarea activitatii limfocitelor Th, dar au si efect supresor direct asupra limfocitelor T si B efectoare. Limfocitele Ts au rol important în inducerea starii de toleranta fata de antigenele exogene, ca si fata de moleculele self. Deficientele functionale ale limfocitelor Ts creeaza predispozitii pentru maladiile autoimune.

Distinctia functionala între limfocitele TCD_4 si TCD_8 nu este totdeauna neta. Unele clone de limfocite TCD_4 au proprietati citotoxice, iar unele clone TCD_8, dupa contactul cu antigenul, prolifereaza si secreta limfochine, ca si limfocitele TCD_4.

Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT)

Desi moleculele de anticorpi au fost printre primele a caror structura chimica s-a identificat, caracterizarea biochimica a receptorului de antigen al celulelor T s-a facut foarte greu, deoarece nu a existat un echivalent celular T al tumorilor de mielom. Molecula cu rol de receptor de antigen a limfocitelor T s-a identificat recent, dupa ce a fost posibila cultivarea liniilor de hibridom de celule T.

Moleculele receptoare de antigen ale limfocitelor T au o larga variatie biochimica, corespunzatoare specificitatii de legare a spectrului foarte larg de antigene.

Ca si în cazul anticorpilor, pentru receptorul de antigen al celulelor T, se foloseste termenul de “idiotip” (Ti), pentru a desemna o molecula a RCT cu un set unic de epitopi asociati, derivati din configuratia sa spatiala unica, complementara pentru legarea specifica a unui epitop antigenic.

Pentru izolarea si identificarea receptorului Ti s-au utilizat anticorpi monoclonali (AMC) anti- Ti, care precipita specific moleculele Ti dintr-un amestec complex de proteine membranare. Examinarea peptidelor în imunoprecipitatele diferitelor clone de celule T, prin metoda electroforezei în SDS-poliacrilamida, a evidentiat ca RCT este un

heterodimer si consta dintr-o glicoproteina de 80-90 kD, care în conditii reducatoare se disociaza în doua peptide de 40 si respectiv 43 kD. Molecula întreaga consta dintr-o pereche de lanturi peptidice, similare ca dimensiuni, legate prin punti S-S.

Lantul α

Lantul β

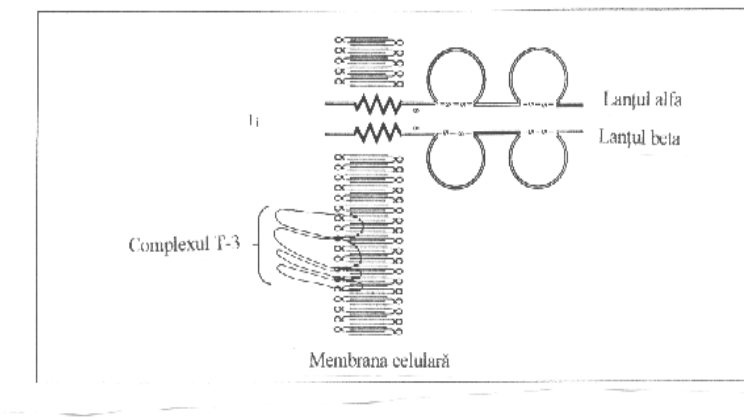


Fig. 27. Structura *receptorului de antigen* al limfocitului T. Molecula este un heterodimer format din lanturile α si β, care se extind prin membrana celulara si au scurte portiuni citoplasmatice. Complexul T_3 este alcatuit din 4 subunitati proteice (γ, δ si 2 ε), localizate îi dublul strat lipidic si în citoplasma.

Cele doua peptide sunt distincte si s-au notat α si β. Lantul α are 248 aminoacizi, cu punctul izoelectric la pH = 5,0-5,5. Lantul β are 282 aminoacizi, iar punctul izoelectric este la pH 6,5-7,0.

Fiecare catena are 4 domenii: unul variabil (V α, respectiv V β), unul constant (C α, respectiv C β), unul transmembranar si unul intracitoplasmatic. Astfel alcatuita, molecula RCT face parte din suprafamilia moleculelor imunoglobulinice. Prin dimensiuni se aseamana cu lantul L al imuno-globulinelor: domeniul variabil al fiecarui lant are 110 aminoacizi, dar pentru ca se ancoreaza în membrana, se aseamana cu lantul H.

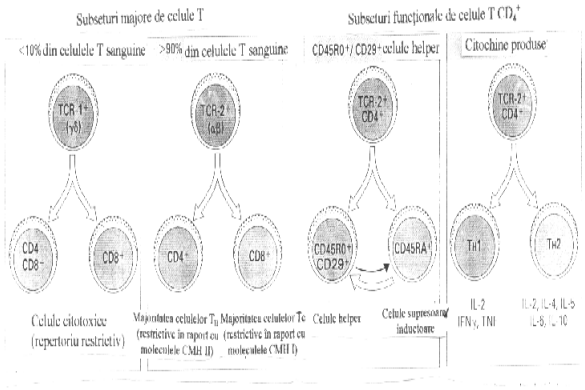
Domeniile variabile (α si β) sunt extrem de variabile (ca si regiunile variabile ale celor doua catene ale imunoglobulinelor) si participa la formarea situsului de combinare al RCT.

Situsul de combinare al RCT este alcatuit din *regiunile hipervariabile* sau regiunile determinante de complementaritate –RDC (3 ale catenei α si 4 ale catenei β) si este aplatizat, adaptat functiei sale de a lega suprafata aplatizata a moleculelor CMH.

La om, RCT heterodimer este asociat cu molecula T_3, o grupare de trei peptide asociate necovalent. Functia probabila a lui T_3 este aceea de *transductor* al semnalului de activare, de la Ti la citoplasma, constituind, prin modificari conformationale, un canal de trecere a ionilor de Ca^{2+} prin membrana, dupa ce receptorul a legat epitopul specific.

S-au identificat doua tipuri de RCT:

Subseturi majore de celule T



Subseturi functionale de celule T CD_4^+

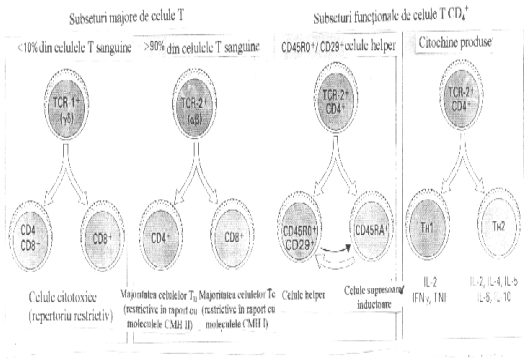


Fig. 28. Subseturi de *limfocite T*, în functie de tipul de RCT (RCT-2, RCT-2). Limfocitele RCT-1 au un repertoriu restrâns de interactiune cu antigenul, dar nu manifesta fenomenul restrictiei CMH. Limfocitele RCT-2 exprima CD_4 sau CD_8, care determina

recunoasterea antigenului asociat cu moleculele CMH II sau CMH I. Limfocitele TCR-2^+ $CD4^+$ sunt divizate pe baza limfochinelor pe care le secreta, în subseturi de celule Th1(stimulatoare ale IMC) si Th2 (stimulatoare ale IMH) (dupa Roitt, 1997).

– RCT-2 este heterodimerul format din polipeptidele α si β, legate prin punti S-S, prezent pe suprafata a circa 90% dintre limfocitele T;

– RCT-1 este asemanator structural cu RCT-2, dar consta din polipeptidele γ si δ, cu o alta specificitate antigenica, identificata prin intermediul anticorpilor monoclonali. Se gaseste pe suprafata a 0,5-15% dintre limfocitele T circulante umane, dar este mai frecvent pe limfocitele intraepiteliale ale mucoasei intestinale.

Limfocitele T γ/δ exprima markerul CD_3 si recunosc antigenul printr-un mecanism asemanator cu acela al limfocitelor T α/β, adica recunosc epitopii asociati cu moleculele CMH I si II, dar frecvent par sa interactioneze cu molecule CMH neclasice, iar specificitatea interactiunii lor cu epitopii antigenici este limitata. Aceste limfocite pot sa recunoasca antigene neconventionale, ca de exemplu, *proteinele de soc termic si antigenele nepeptidice (glucidice).*

În general, limfocitele cu RCT-1 (γ/δ) sunt negative pentru markerul CD_4 si pentru CD_8, desi unele exprima nivele scazute ale unuia dintre markeri.

Unele studii sugereaza ca aceste celule contribuie la raspunsul initial al gazdei, la diferiti agenti infectiosi: virusuri, bacterii(în special micobacterii), paraziti, dar si la raspunsul anti-tumoral. Ele par sa constituie “prima linie de aparare”. Ipoteza este în acord cu localizarea lor anatomica, la poarta de intrare în organism, în tesuturile nelimfoide (tegument, intestin), dar si în situsurile inflamatorii. Limfocitele T γ/δ se aglomereaza în focarele inflamatoare cronice(membrana sinoviala, leziunile asociate cu lupusul eritematos diseminat).

La rumegatoare, 30-80% din totalul limfocitelor T circulante au receptor γ/δ, valorile maxime înregistrându-se la organismele nou-nascute. La alte specii, numarul acestor limfocite T este mic. Abundenta lor numerica la rumegatoare este corelata, probabil, cu bacteriemia masiva care însoteste procesul digestiv.

În esenta, markerii RCT si CD_3 sunt definitorii pentru limfocitele T.

Limfocitele T au un marker distinctiv pe suprafata lor, fata de limfocitele B: Thy 1 (CD_{90}). Acest marker poate fi exprimat si pe alte tipuri celulare si lipseste la o mica proportie a limfocitelor T.

Celulele NK

Celulele NK (natural killer) reprezinta circa 15% din totalul limfocitelor sanguine. Ele deriva din maduva osoasa si au origine comuna (acelasi progenitor), ca si celulele T. *In vitro*, sunt neaderente si nefagocitare, ceea ce le aseamana cu limfocitele. Din punct de vedere morfologic, celulele NK sunt mari, granulare (*LGL*, *l*arge *g*ranular *l*ymphocytes), având citoplasma mai bogata decât celelalte limfocite, cu granulatii azurofile.

Celulele NK nu au nici unul din receptorii de antigen caracteristici limfocitelor T sau B si de aceea au fost denumite celule “nule”.

Celulele NK au pe suprafata lor unii markeri caracteristici limfocitelor: au receptor pentru Fc γ de mica afinitate, formeaza rozete E, au receptor de mica afinitate pentru IL-2, produc IL-2 si IFN γ. Au si receptori caracteristici seriei mieloide.

În dezvoltarea lor, celulele NK nu sunt dependente de timus.

Celulele NK au viata scurta si reprezinta o linie importanta, primordiala în evolutie, cu rol esential în mecanismele de aparare înascuta a organismului: sunt active în respingerea grefelor si a celulelor modificate sub raport antigenic. Functia celulelor NK este de a recunoaste si de a liza anumite celule tumorale si celule infectate cu virusuri. Celulele NK au lizat celulele liniilor B limfoblastoide transformate de EBV, deficiente în molecule CMH I, dar nu au mai lizat aceste tinte dupa transfectia cu genele HLA-B sau HLA-C. Mecanismul recunoasterii celulelor purtatoare de molecule nonself nu este cunoscut. Se admite ca celulele NK recunosc moleculele CMH si se activeaza când receptorii lor nu întâlnesc moleculele CMH pe suprafata celulelor tinta sau când moleculele CMH au o densitate mai mica decât cea normala. Efectul interactiunii este liza celulei tinta.

Actiunea definitorie a celulelor NK este *citotoxicitatea*. Ele lizeaza fara restrictie CMH, celulele tumorale sau pe cele infectate cu virusuri.

Activitatea celulelor NK este foarte înalta la soarecele nud (fara timus) sau la soarecii timectomizati neonatal. Dupa activare, celulele NK elibereaza IFN γ.

Cel mai studiat receptor membranar al celulelor NK este receptorul de mica afinitate pentru Fc al IgG (CD $_{16}$).

O subpopulatie distincta a celulelor NK o reprezinta *celulele K* (killer). Ele sunt tot LGL, dar spre deosebire de celulele NK, exprima *receptorul de mare afinitate pentru Fc* γ. Actiunea lor principala este *citotoxicitatea mediata de anticorpi* (ADCC), fata de celulele modificate antigenic.

In vitro, limfocitele T din sânge, sub actiunea stimulatoare a unor

denumite *LAK* (*l*ymphokine *a*ctivated *k*illers). *In vitro,* prin adaugarea IL-2 si a antigenului tumoral, devin citotoxice fata de celulele tumorale omologe.

Bazele genetice ale diversitatii receptorilor de antigen

Functia imunitara se bazeaza pe interactiunea specifica dintre receptorii limfocitari si epitopii nonself. Diversitatea specificitatii de legare a receptorilor limfocitari este paradigma pe care se cladeste întregul edificiu al stiintei imunologice. Diversitatea receptorilor caracterizeaza ambele populatii de limfocite.

Limfocitele B ale vertebratelor sintetizeaza anticorpi cu o mare diversitate a specificitatii situsului de combinare (10^8- 10^9 tipuri diferite, care leaga un numar echivalent de epitopi antigenici diferiti). Intelegerea determinismului genetic al acestei uriase diversitati a întârziat mult fata de alte aspecte ale functionalitatii sistemului imunitar.

Prima teorie moderna cu privire la specificitatea anticorpilor a fost teoria “lanturilor laterale” a lui Ehrlich (1900). Lanturile laterale sunt receptori preformati, inserati în membrana limfocitelor

Legarea antigenului pe receptorul membranar al limfocitului va stimula celula sa sintetizeze molecule identice cu receptorul de antigen, care trec în ser ca anticorpi. Aceasta teorie a anticipat *teoria selectiei clonale*, precum si ideea ca sistemul imunitar poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul. Receptorii limfocitari sunt preformati, au o structura asemanatoare cu aceea a anticorpilor serici si ramân în asteptarea întâlnirii cu antigenul specific. Ehrlich considera, însa, în mod eronat, ca o celula poseda receptori pentru mai multe antigene. Teoria a fost abandonata când Landsteiner a aratat ca sinteza anticorpilor este indusa si de antigenele artificiale (conjugate haptena-proteina), neîntâlnite niciodata în natura si astfel specificitatea anticorpilor a fost explicata prin *teoriile instructive* (Breinl si Haurovitz, 1930). Aceste teorii atribuiau un rol important gruparilor determinante de specificitate. Epitopii ar patrunde în celula care sintetizeaza anticorpi si ar actiona ca matrita, imprimând polipeptidelor în curs de sinteza, o configuratie spatiala complementara.

Teoriile instructive au fost infirmate dupa evidentierea diversitatii enorme a moleculelor de anticorpi, care se sintetizeaza dupa stimularea cu un antigen, precum si de faptul ca o celula B si descendentii ei produc anticorpi cu o specificitate unica fata de un epitop.

În 1959, Mc Farlane Burnet a formulat *teoria selectiei clonale,* care postuleaza ca sistemul imunitar este reprezentat de un numar urias de clone de limfocite, corespunzator unui numar echivalent de epitopi. Clona este o populatie de celule identice din punct de vedere genetic, descendente ale unei singure celule de origine. Diversitatea clonelor este reflectata în specificitatea fiecareia de a recunoaste un anumit epitop si este generata în timpul diferentierii celulelor limfoide din celulele de origine. Toate celulele unei clone poarta pe suprafata lor, molecule identice de imunoglobulina, care functioneaza ca receptori specifici de antigen. Dupa interactiunea cu antigenul, molecula receptor va fi sintetizata si secretata, cu o rata foarte înalta, ca anticorp. Epitopii antigenici selectioneaza din aceasta colectie imensa, clonele de limfocite care au receptori complementari din punctul de vedere al configuratiei spatiale si determina proliferarea si diferentierea lor în celule producatoare de anticorpi. Toate celulele clonei au aceiasi specificitate pentru antigen.

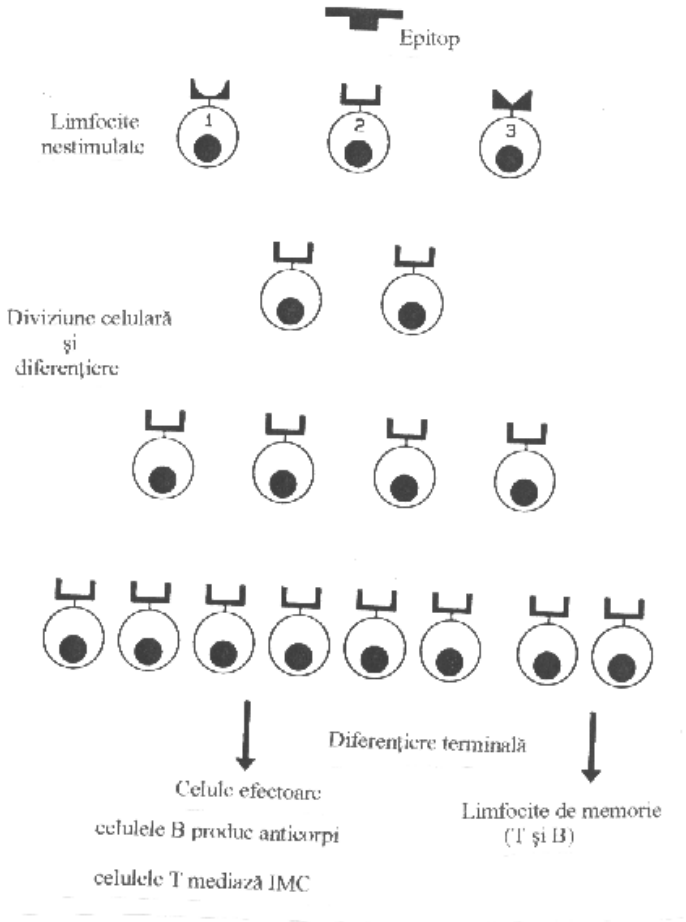


Fig. 29. Ilustrarea schematica a *teoriei selectiei clonale*. Fiecare clona de limfocite are pe suprafata sa, un receptor de antigen, specific pentru un epitop antigenic complementar. La patrunderea în organism, antigenul selecteaza acele clone care pot sa lege specific epitopii complementari. Celulele selectate sunt stimulate sa se divida si sa se diferentieze în celule efectoare mature si celule de memorie.

Sistemul imunitar functioneaza pe principiul “gata facut”, adica receptorul de antigen preexista pe suprafata limfocitelor, astfel încât problema diversitatii anticorpilor trebuie explicata pe baze genetice.

Teoria selectiei clonale este argumentata de câteva dovezi experimentale:

– limfocitele imunocompetente au specificitati distincte pentru diverse antigene: de exemplu, numai 1-2% dintre limfocite leaga albumina serica bovina. Numarul celulelor care leaga un anumit antigen creste mult dupa imunizarea cu antigenul respectiv;

– limfocitele unei clone au receptori si produc anticorpi cu o singura specificitate, fata de un singur epitop. Faptul ca initial se sintetizeaza IgM si ulterior IgG, nu este un contraargument, deoarece anticorpii celor doua clase au regiuni variabile identice si au aceiasi specificitate de legare cu epitopul;

– clona de celule cu specificitate de legare a unui epitop se poate elimina selectiv prin pasajul celulelor pe o coloana de afinitate, cu bile de sticla tapetate cu antigenul specific. Celulele care au receptori pentru antigen adera de coloana, iar celelalte trec, ceea ce denota ca limfocitele sunt angajate sa raspunda la un antigen, înainte de a se întâlni cu el, prin receptorii lor specifici preformati;

– incubarea limfocitelor cu un antigen puternic radiomarcat, produce moartea numai a celulelor care îl leaga specific.

Mecanismele genetice ale diversitatii imunoglobulinelor

Sustinuta de dovezi experimentale, teoria selectiei clonale este acceptata. Se pune problema modalitatii de codificare genetica a sintezei unei mari diversitati moleculare de anticorpi. Potentialului imens al unui organism de a sintetiza milioane de tipuri de molecule diferite de anticorpi, ar trebui sa-i corespunda un numar egal de gene codificatoare. Generarea potentialului urias de diversitate genetica s-a explicat în diferite moduri:

– teoria *liniei germinale* considera ca genele care codifica sinteza domeniilor VL si VH se gasesc în celula germinala. In genomul fiecarui individ s-ar gasi un numar imens de cistroni care s-ar transmite ereditar. Pentru cele 10^8 – 10^9 specificitati de legare ale moleculelor de anticorpi, ar exista tot atâtea gene codificatoare. Teoria nu explica modalitatile de pastrare în cursul evolutiei, a acestui numar urias de gene si nici posibilitatea sintezei anticorpilor specifici fata de antigenele sintetice;

– teoria *recombinarilor somatice* presupune existenta unui numar limitat de cistroni codificatori ai domeniilor variabile ale moleculei de anticorp, în linia germinala. Diversificarea specificitatii de combinare a anticorpilor s-ar realiza prin recombinari somatice între un numar limitat de cistroni, asociate cu diviziunile celulare în cursul diferentierii limfocitelor;

– teoria *mutatiilor somatice* considera ca repertoriul genelor pentru

sinteza imunoglobulinelor este construit *de novo* în cursul dezvoltarii sistemului imunitar, pornind de la un numar mic de gene ale liniei germinale, prin mutatii la nivelul celulelor somatice. Selectia pozitiva (pastrarea viabilitatii clonelor limfoide cu receptori pentru antigenele exogene) s-ar face sub influenta antigenelor care selectioneaza si stimuleaza proliferarea celulelor mutante, care sintetizeaza anticorpi cu situs de combinare complementar. Teoria presupune persistenta în organism, pentru perioade lungi de timp, a unui numar mare de antigene, ceea ce este improbabil;

– teoriile *mixte* presupun existenta unui numar limitat de cistroni codificatori ai domeniului variabil (V), în celulele liniei germinale. Diversificarea imensa a potentialului de codificare si sinteza s-ar face prin recombinari somatice între acesti cistroni, în timpul diviziunilor celulare, declansate de recunoasterea si stimularea antigenica.

Ipoteza lui Dreyer si Bennett (1965) explica diversitatea anticorpilor prin însasi particularitatile lor de structura. Existenta unei singure gene codificatoare pentru regiunile V si C ale moleculei de imunoglobulina este improbabila, deoarece nu este posibil ca o gena sa sufere atâtea variatii corespunzatoare capatului NH_2 al catenei polipeptidice si sa ramâna constanta pentru secventa codificatoare a capatului COOH. Nu se cunoaste nici o situatie în care segmentul ADN corespunzator regiunii constante a unei proteine sa fi ramas nemodificat, iar cel codificator al regiunii variabile sa fie expus fenomenelor mutationale cu o frecventa atât de mare.

Singura modalitate de a explica variabilitatea regiunii N-terminale si constanta regiunii C-terminale este acceptarea ideii ca molecula de imunoglobulina este codificata de mai multe gene distincte – cel putin doua - una pentru regiunea variabila si una pentru regiunea constanta.

În acord cu aceasta ipoteza, în celulele limfoide embrionare ar exista *câteva sute de gene codificatoare ale regiunii variabile si o gena pentru regiunea constanta*, care s-ar asocia la întâmplare în cursul diferentierii limfocitelor B. O molecula functionala de imunoglobulina s-ar sintetiza ori de câte ori recombinarea genetica aduce în limfocitul precursor al plasmocitului, o gena V în apropierea genei C corespunzatoare. Astfel s-ar forma cuplurile de gene functionale VL-CL si VH-CH, codificatoare ale celor doua catene.

Ipoteza venea în contradictie cu câteva dogme ale biologiei celulare si moleculare:

– dogma conform careia, o gena codifica un polipeptid;

– dogma constantei genomului pe toata perioada de dezvoltare a unui organism;

– dogma imposibilitatii rearanjarii genelor într-o celula somatica;

– dogma continuitatii informatiei genetice. Din aceste motive, ipoteza nu a fost acceptata.

Teoria *genelor multiple* codificatoare ale unei molecule de imunoglobulina a fost confirmata ulterior prin tehnica cineticii de hibridare (Leder si Swan, 1971). Autorii au aratat ca atât în celulele limfoide embrionare cât si în celulele tumorii de mielom, *regiunea constanta* a catenelor H si L ale moleculei de imunoglobulina *este codificata de o singura gena,* iar *regiunea variabila este codificata de mai multe gene*.

Prin tehnica hibridarii, s-a comparat distributia genelor codificatoare în ADN din doua surse:

– dintr-o tumora de mielom de soarece, ce secreta un lant k;

– din celulele limfoide embrionare (imature) de soarece, ce nu sintetizeaza imunoglobuline.

ADN din ambele surse a fost clivat cu enzime de restrictie, în fragmente separate ulterior prin electroforeza.

Fragmentele codificatoare ale lantului k au fost identificate prin hibridare cu ADNc, obtinut prin transcrierea inversa a ARNm al lantului k. S-au folosit doua tipuri de ARNm ale lantului k:

– un fragment pentru lantul Lk întreg (cu domeniile Vk si Ck);

– un fragment corespunzator jumatatii 3’ a ARNm, codificator al domeniului Ck;

Pentru ambele categorii de molecule de ARNm s-au obtinut fragmentele de ADNc corespunzatoare.

În proba cu ADN obtinut din limfocitele embrionare, ADNc al fragmentului Ck a hibridat cu un fragment de ADN ce contine gena Ck, iar ADNc pentru întregul lant k a hibridat atât cu fragmentul genei Ck, cât si cu un alt fragment de ADN rezultat prin clivarea cu enzimele de restrictie, care probabil contine gena Vk.

În concluzie, *în celulele limfoide embrionare, cele doua gene codificatoare ale catenei k se gasesc situate la distanta, în fragmente de restrictie diferite*.

În proba cu ADN obtinut din celulele limfoide de mielom, ambele probe de ADNc, corespunzatoare domeniului Ck si lantului întreg Vk au hibridat într-un singur fragment.

În concluzie*, în limfocitele mature, cele doua fragmente codificatoare ale lantului k se gasesc în vecinatate imediata, în acelasi fragment de restrictie.*

În esenta, genele functionale pentru sinteza imunoglobulinelor în celulele mature sunt rezultatul rearanjarii prin *procese de transpozitie*, a unor segmente genice mici, mostenite în ADN al liniei germinale.

Rearanjarile au loc în limfocite, pe masura ce ele se diferentiaza din celule imature precursoare, în limfocite B producatoare de anticorpi.

Singurul mecanism care aduce cele doua gene într-un ansamblu functional este reunirea prin *transpozitie* si *recombinarea genetica* a celor doua secvente de ADN pentru a forma o gena activa L si o gena activa H.

Polipeptidele L si H sunt codificate de trei grupuri de gene nelincate:

– *grupul genelor H,* pentru sinteza catenelor γ, μ, α, δ, ε (situate pe cromosomul 14 la om si 12 la soarece);

– *grupul genelor k,* codificatoare ale lantului Lk (situate pe cromosomul 2 si respectiv 6);

– *grupul genelor* λ, pentru sinteza catenei L λ (situate pe cromosomul 22 si respectiv 6).

Fiecare din aceste familii cuprinde un numar controversat de gene codificatoare ale regiunii variabile, situate separat, la distanta, de gena codificatoare a regiunii constante a moleculei de imunoglobulina.

Genele pentru catena L a imunoglobulinei de soarece s-au studiat prin clonarea fragmentelor de ADN într-un fag ce se replica în celulele de *E. coli*.
S-a obtinut astfel o cantitate suficient de mare de ADN al genelor codificatoare pentru catenele Lk si L λ, atât din limfocitele embrionare, cât si din celulele limfoide mature de mielom, producatoare de imunoglobuline.

Gena codificatoare a lantului λ este formata din 4 segmente separate, ordinea lor în directia 5' --- 3' find *L* λ*, V* λ*, J* λ *si C* λ.

Segmentul genic L λ codifica 15-20 de aminoacizi ai secventei leader de la extremitatea N-terminala a catenei polipeptidice. Aceasta secventa este clivata pe masura ce lantul strabate membrana reticulului endoplasmic si lipseste din molecula de imunoglobulina matura

Segmentul genic V λ codifica cea mai mare parte a regiunii variabile a lantului λ, specificând legarea aminoacizilor de la pozitia 1 la 97.

Segmentul genic J λ (J, joining = legare) codifica restul regiunii variabile, adica aminoacizii între pozitiile 98-110.

Segmentul genic C λ codifica secventa constanta a catenei L, între pozitiile 111-214.

Familia de gene codificatoare ale *catenei Lk* este organizata asemanator cu a genelor L λ: *secvente leader Lk*, asezate în tandem cu cele circa *250 de segmente genice Vk*, 5 *segmente genice Jk* strâns legate între ele (din care unul este defectiv) si la o distanta de 1000 pb se gaseste un singur *segment genic Ck*.

Genele pentru catena H a imunoglobulinelor au o organizare asemanatoare celei a genelor catenei L. Segmentele genice codificatoare ale catenei H sunt mai numeroase si au o organizare mai complexa, deoarece contin în plus secvente codificatoare D (diversity), intercalate între secventele VH si JH. Cele circa 12 secvente genice D codifica fiecare 5-15 aminoacizi si amplifica diversitatea biochimica a anticorpilor. Ele confera cea mai mare variatie biochimica a catenei H.

Secventele genice VH par a fi în numar de câteva sute. Fiecare segment VH este asociat cu segmentul LH, codificator al secventei leader. La soarece sunt 200-300 de segmente genice VH, 10-20 segmente D, 4 gene JH si 10 gene CH, iar la om sunt circa 100 segmente genice VH(din care circa jumatate sunt functionale), circa 30 de gene D si 9 gene J, din care 6 sunt functionale. Genele VH sunt diseminate în 4 aglomerari.

Genele CH, codificatoare ale regiunii constante ale claselor si subclaselor de catene H, se gasesc în ordinea: μ, δ, γ_3, γ_1, ε ϕ (nefunctionala), α_1, γ_2, γ_4, ε, α_2.

Fiecare segment genic CH contine mai multi exoni. Fiecare exon codifica un domeniu structural al moleculei de imunoglobulina.

Asamblarea genei active pentru catena L. Pentru a rezulta o gena functionala Lk, unul din cele circa 250 segmente genice Vk se uneste cu unul din cele 4 segmente genice functionale Jk, printr-un proces de recombinare probabilistica. Impreuna cu gena Ck, se formeaza ansamblul VJC, codificator al catenei Lk, transcris ulterior în ARN premesager. Prin procesul de clivare si înadire, intronii sunt eliminati si rezulta ARNm pentru catena Lk. Se sintetizeaza lantul polipeptidic, iar secventa leader este clivata în cursul transferului prin membrana reticulului endoplasmic. Rearanjarea functionala a genei pentru catena L, stopeaza rearanjarea genelor ce codifica acelasi izotip (fenomenul excluderii alelice).

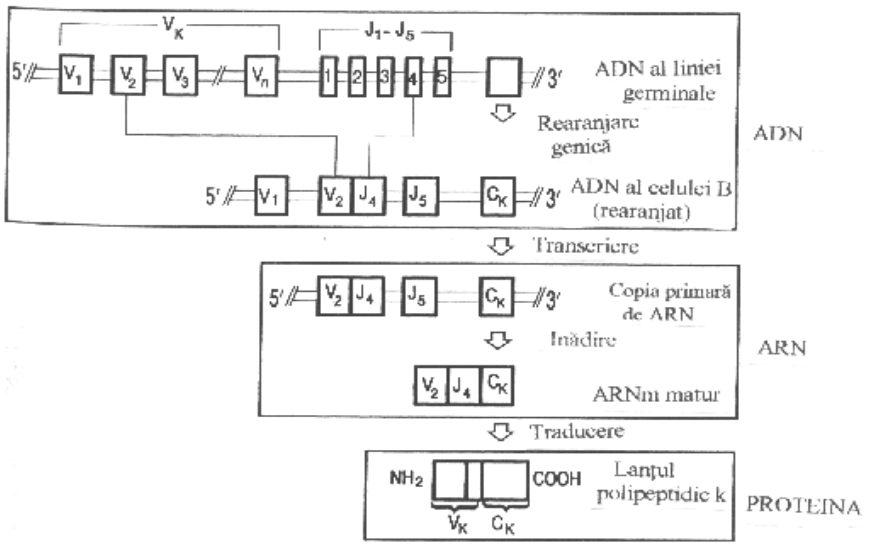


Fig. 30. *Recombinarea genelor* umane codificatoare ale catenei Lk a imunoglobulinelor. Gena functionala în limfocitul B matur, rezulta prin recombinarea uneia din numeroasele gene V, cu una din cele 4 gene J functionale si gena Ck. Recombinarea poate avea loc între oricare din genele V si J. Schema ilustreaza rearanjarea genica între $V_2 – J_4 – C_k$.

Asamblarea genei active pentru catena H este similara asamblarii genei active pentru catena L, dar mai complexa, deoarece implica recombinarea a trei regiuni genice distincte ale domeniului variabil: VH, D si JH. Initial s-ar realiza legarea segmentelor genice D si JH, urmata de transpozitia uneia din genele VH în vecinatatea complexului D-JH, pe unul din cromosomii celulei pre-B. Rearanjarile sunt posibile datorita secventelor de recunoastere ale genelor V, D, J.

De cele mai multe ori, rearanjarile genice au loc intracromosomal si foarte rar intercromosomal. Daca rearanjarea este nefunctionala, are loc rearanjarea genelor în celalalt cromosom pereche. In general, rearanjarea are loc la situsul k, iar daca rearanjarea în cei doi cromosomi este neproductiva, este initiata rearanjarea la situsul λ.

La complexul VH-D-JH este translocata una din genele CH, care codifica clasa si subclasa catenei H.

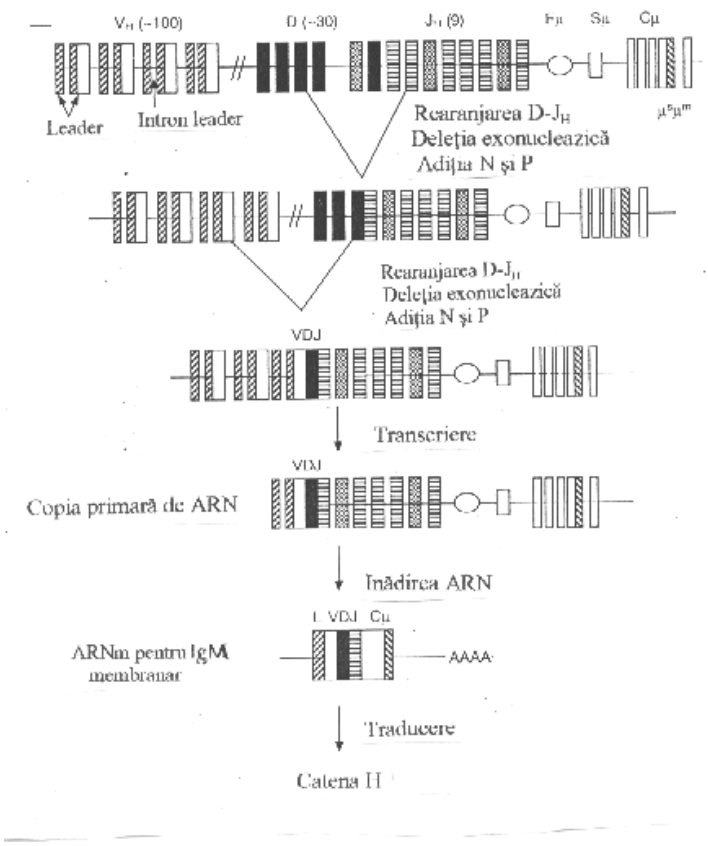


Fig. 31. Modelul organizarii *genei umane codificatoare a catenei H*. Genele regiunii V_H sunt multiple (50-300), fiecare cu secventa leader. Reunirea segmentului genic D cu gena J_H precede legarea genei V de perechea DJ_H. Intronul genei leader (L) este îndepartat prin clivarea si reunirea exonilor ARN. Reunirea alternativa poate genera imunoglobulina de membrana (m) sau secretata (s). Cifrele indica numarul aproximativ de gene de segmente genice. Eu = regiune activatoare; Su = regiunea de comutare (switch) (dupa Potter, 1998).

Imensa diversitate a specificitatii de legare a anticorpilor este generata prin câteva mecanisme:

1) *Diversitatea combinatiilor posibile* prin asamblarea întâmplatoare a segmentelor genice. De exemplu, cele circa 250 segmente genice Vk si cele 4 segmente functionale Jk produc circa 1000 (250 x 4) combinatii Vk-Jk. Pentru gena H exista posibilitatea unui numar superior de combinatii VH – D – JH: circa 250 segmente VH, 12

segmente D si 4 segmente JH (250 x 12 x 4 = 12000).

2) *Flexibilitatea jonctionala a segmentelor genice*. În momentul asamblarii complexelor VH – D – JH sau VL – JL se produc deletii, aditii, substitutii de baze, care modifica circa 3 aminoacizi la fiecare jonctiune. Numarul variantelor biochimice ale moleculelor de imunoglobulina creste de 3 ori pentru lantul L (1000 x 3) si de 9 ori pentru catena H (12 000 x 9 = 100000).

Aditiile si deletiile care însotesc legarea segmentelor genice VL-JL trebuie sa se faca astfel încât sa se pastreze unicul cadru de citire al tripletelor pentru fiecare segment genic V si J. Daca legarea segmentelor genice introduce sau pierde 1 sau 2 nucleotide (sau alt numar nedivizibil cu 3), secventa în aval nu va fi citita. Aceasta este o rearanjare genica neproductiva.

Segmentele genice D pot fi citite în toate cele 3 cadre de citire, în diferite recombinari V-D-J, ceea ce contribuie semnificativ la diversitatea anticorpilor.

3) *Diversitatea combinatoriala* prin împerecherea întâmplatoare a catenelor H si L. Daca oricare lant L poate fi împerecheat cu oricare lant H, vor rezulta peste 10^8 variante de imunoglobuline (100000 H x 3000 L).

4) *Aditii de nucleotide în regiunea N*. Cea mai variabila regiune a moleculei de anticorp este cea de a III-a secventa determinanta de complementaritate a catenei H (aminoacizii 86-91), locul de unire a segmentelor genice VH-D si D-JH. Aici se gasesc scurte secvente de aminoacizi, foarte variabile, denumite *regiuni N*. Ele sunt codificate de secvente de nucleotide adaugate de enzima *terminal-deoxinucleotidil-transferaza* (TdT), activa în celulele limfoide imature, capabila sa adauge nucleotide la capatul 3’ al catenei de ADN în curs de sinteza, fara sa necesite matrita. Activitatea TdT este minima la fat si la noul-nascut, dar este stimulata postnatal. Enzima actioneaza preponderent pe genele catenei H, dar regiunile N s-au identificat si la jonctiunile V-J ale catenei L.

5) *Mutatiile somatice*. Un numar de ordinul milioanelor de variante ale regiunii V pot sa apara prin substitutii unice de nucleotide în segmentul genic V. Acesta este fenomenul *hipermutatiei somatice* a domeniilor variabile, care este activat mai ales în conditiile imunizarii intense, ceea ce explica cresterea afinitatii anticorpilor pentru epitopul stimulator.

Hipermutatia somatica este mecanismul esential pentru generarea

diversitatii anticorpilor. La om, hipermutatia somatica se produce în prezenta antigenului si are loc în centrii germinativi din tesutul limfoid periferic.

Rearanjarile genice se produc, initial, la nivelul genei pentru sinteza catenei H. Catena H apare prima în citoplasma limfocitelor. Ulterior are loc rearanjarea genelor ce codifica sinteza catenei L.

Rearanjarea genelor se desfasoara continuu în limfocitele B din maduva osoasa hematogena. Limfocitele care nu genereaza o rearanjare genica productiva sunt eliminate, nefiind utile sistemului imunitar. Probabil ca pentru o rearanjare productiva sunt necesare, statistic, multe altele neproductive, ceea ce presupune ca pentru fiecare limfocit functional se pierde un numar mare de celule. Teleonomic însa, risipa este justificata de importanta esentiala a functiei imunitare pentru organism.

Mecanismele de recombinare genica permit ca în contextul existentei a mai putin de 1000 de gene în linia germinala, organismul sa produca o mare diversitate de anticorpi (câteva miliarde), ceea ce constituie *repertoriul imunoglobulinelor*.

Descoperirea mecanismelor genetice de transpozitie, generatoare a uriasei diversitati a specificitatii de combinare a anticorpilor, a deschis o noua cale a întelegerii asupra modului în care informatia genetica poate sa fie diversificata.

Mecanismele de transpozitie sunt active în limfocitele B, dar si în celulele liniei T, în care codifica o diversitate asemanatoare a receptorului de antigen al acestor celule, dar nu au fost identificate pentru alte gene.

Mecanismele genetice ale generarii diversitatii RCTi

Mecanismele genetice generatoare ale diversitatii specificitatii de legare a RCTi sunt asemanatoare cu cele care genereaza diversitatea imunoglobulinelor. Calculele teoretice sugereaza ca exista posibilitatea a cel putin 10^{14} combinatii TCR 2.

Genele codificatoare pentru Ti s-au studiat dupa clonarea ADNc, obtinut prin metoda *hibridarii substractive** . S-a studiat distributia genelor atât în celulele T embrionare, cât si în limfocitele T mature. Se cunosc mai bine genele care codifica lantul β. Ele sunt plasate în 4 regiuni distincte, care corespund segmentelor V, D, J, C. Nu se cunoaste numarul genelor în fiecare regiune.

Prima treapta este sinteza ADNc din ARNm al limfocitelor T. ADNc

este hibridat cu ARNm în mare exces, din limfocitele B. Secventele de ADNc care nu hibrideaza cu ARNm, probabil vor reprezenta secventele de ARNm specifice numai limfocitelor T.

Regiunea C are doua segmente genice distincte: C β 1 si C β 2. Regiunea J are doua grupuri de minigene: J β 1 si J β 2, fiecare cu câte 7 segmente genice (unul este nefunctional). Regiunea D are un numar nedefinit de gene (D1 - Dy), iar regiunea V are circa 30 de gene.

Formarea unei gene functionale implica rearanjarea celor 4 segmente genice, dar rearanjarile sunt mai versatile decât ale genelor codificare pentru moleculele de imunoglobuline si rezulta mai multe variante: Vb - Jb ; Db – Db; Db – Jb; Vb – Db – Jb. Tipul dominant de recombinare pare a fi V - D - J - C.

Diversitatea RCT se realizeaza prin mai multe mecanisme:

– numarul mare de gene V, D, J;

– asocierile combinatoriale diverse ale segmentelor V – D- J. Ele sunt mai diversificate decât ale genelor pentru imunoglobuline, fiind posibile rearanjari D – D si V – J;

– diversitatea jonctionala prin deletie sau aditie de baze, la legarea segmentelor V, D, J.

Rearanjarile genice pentru RCTi se produc în timocitele imature, în zona corticala a timusului, înainte de a ajunge în zona medulara.

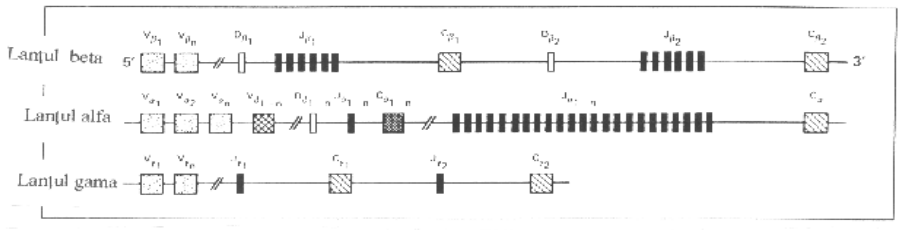


Fig. 32. Genele codificatoare ale *receptorului limfocitar* de antigen. Catenele α, β si γ, δ sunt codificate de gene V (ale regiunii variabile), gene D, J si o regiune genica constanta (C).

Rearanjarea genelor V β pe unul din cromosomi, supreseaza rearanjarea genelor pe cromosomul pereche (excludere alelica), astfel ca fiecare celula exprima un singur tip de catena RCT β. Rearanjarea genelor alele α nu este supusa fenomenului excluderii alelice si de

aceea fiecare celula are doua tipuri de receptori de antigen (RCT), fiecare având propriul sau lant α, dar lantul β este comun. Surprinzator, celulele CD_8 din epiteliul intestinal, care sunt generate extratimic, au RCT format din homodimeri α - α.

DEZVOLTAREA ONTOGENETICA A SISTEMULUI IMUNOCITAR

Limfocitele T si B se diferentiaza dintr-o *celula stem* (celula mama, tulpina, de origine), care nu a fost identificata, fiind doar ipotetica, deoarece nu are caractere structurale distinctive.

Celula stem este de origine mezenhimala. La pasari si mamifere, celula stem apare în *mezenhimul paraaortic* al embrionului, având un potential foarte înalt de multiplicare si diferentiere.

Celula stem este pluripotenta, chiar totipotenta, deoarece prin multiplicare si diferentiere, genereaza toate categoriile de celule sanguine: granulocite, monocite, limfocite, mastocite, megacariocite, eritrocite. Diferentierea initiala a celulei stem este pe linie eritrocitara si mieloida, iar diferentierea pe linie *limfoida* este ulterioara si simultana cu procesul de maturare.

Maturarea limfocitelor semnifica dobândirea *imunocompetentei*, adica a capacitatii de a recunoaste specific antigenul si de a se activa.

Din mezenhimul paraaortic, celula stem migreaza în *sacul vitelin*, unde, pentru un interval de timp se desfasoara *hematopoeza*.

Sacul vitelin este sediul esential al diferentierii celulelor stem pe cale limfoida, la pasari si mamifere, înainte de migrarea lor în *ficat si splina.* Dupa cultivarea embrionului total de soarece, fara sacul vitelin, înainte de migrarea si colonizarea sa cu celule stem limfoide, nu s-a evidentiat diferentiere celulara pe cale limfoida. Ulterior în viata embrionara, functia hematopoetica este preluata de ficat si splina. In aceste organe, celulele stem se divid cu o rata înalta si se diferentiaza pe linie eritrocitara, mieloida (granulocitara), monocitara, limfoida.

În ultima parte a vietii embrionare, functia hematopoetica este preluata de *maduva osoasa*, chiar daca ficatul si splina pastreaza o activitate hematopoetica foarte limitata si un scurt interval dupa nastere.

Celulele limfoide diferentiate în maduva osoasa, la pasari,

migreaza initial în splina si ficat, iar de aici migreaza în organele limfoide centrale (timus si bursa lui Fabricius).

La mamifere, din *maduva osoasa*, limfocitele migreaza în *ficat si splina*. Unele îsi dobândesc competenta imunitara chiar în maduva osoasa, în ficat sau în splina, organe care îndeplinesc functiile bursei la pasari, iar altele migreaza în *timus*. Acesta este *circuitul primar* al limfocitelor, în care se produce *diferentierea independenta de antigen*, în cursul careia limfocitele devin *imunocompetente*. Aceasta etapa se desfasoara în organele limfoide primare (timus, bursa lui Fabricius si echivalentii bursali ai mamiferelor). In cursul ei, limfocitele dobândesc receptori specifici de antigen.

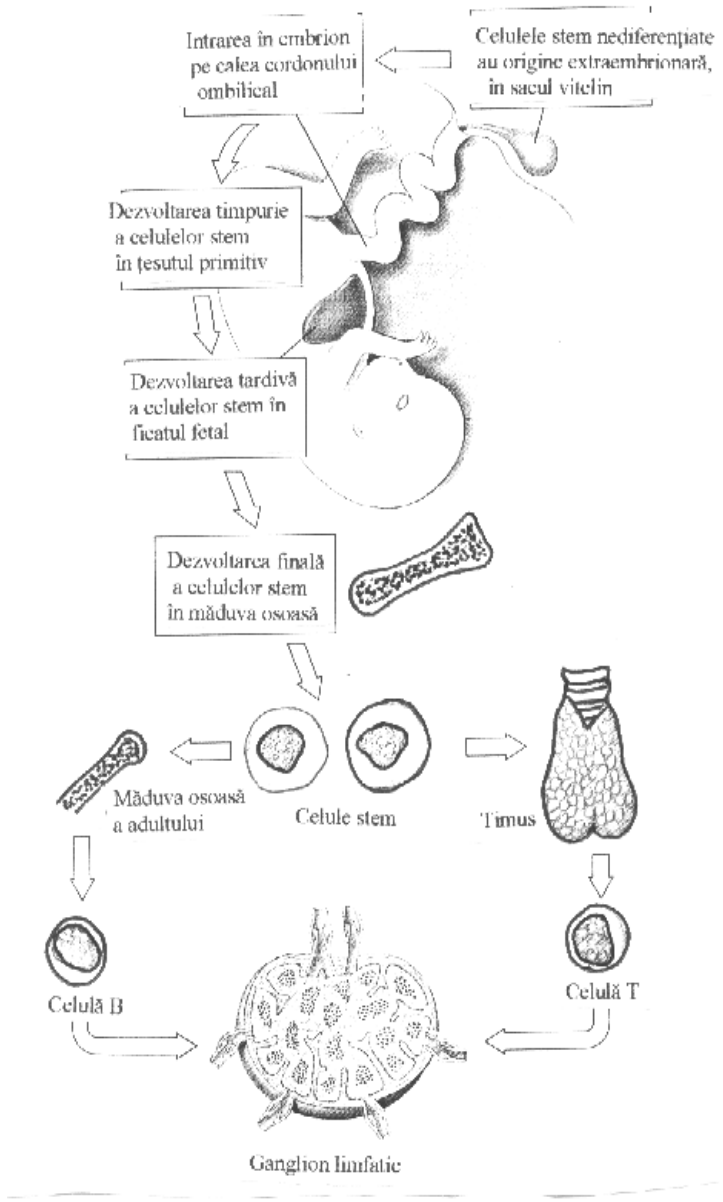

Intrarea în embrion pe calea cordonului ombilical
Celulele stem nediferențiate au origine extraembrionară, în sacul vitelin
Dezvoltarea timpurie a celulelor stem în țesutul primitiv
Dezvoltarea tardivă a celulelor stem în ficatul fetal
Dezvoltarea finală a celulelor stem în măduva osoasă
Măduva osoasă a adultului
Celule stem
Timus
Celulă B
Celulă T
Ganglion limfatic

Fig. 33. Diferentierea celulelor stem în limfocite T si B are loc în timus si respectiv, în maduva osoasa. Limfocitele mature migreaza în tesuturile limfoide (dupa Black, 1996).

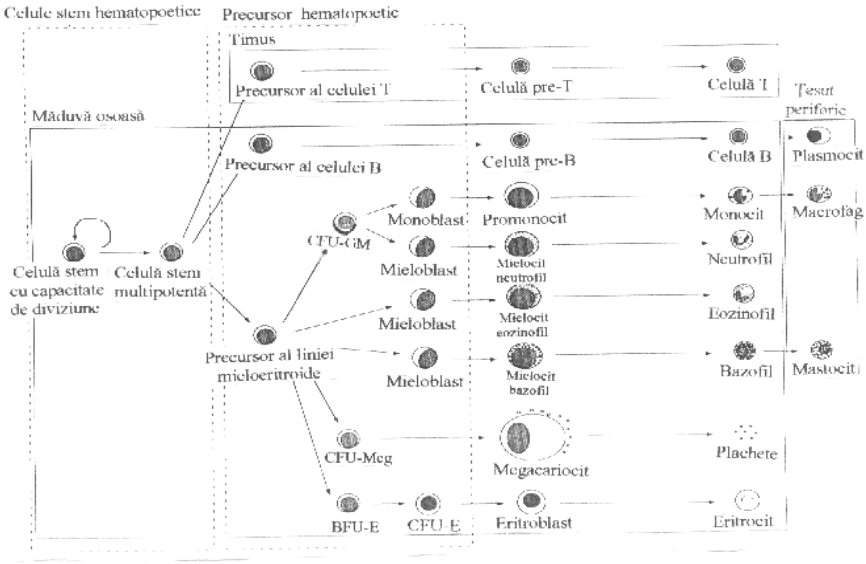


Fig. 34. Un model al cailor de *diferentiere a celulelor sanguine* din celulele stem hematopoetice, în raport cu conditiile de mediu. Celulele stem si cele imature sunt delimitate de linii întrerupte (dupa Ikuta, 1992).

A II-a faza a diferentierii limfocitelor este *dependenta de antigen* si se produce în *circuitul secundar.* Limfocitele imunocompetente trec în circuitul sanguin si de aici migreaza în tesuturile limfoide secundare, de unde, pe cale limfatica se reîntorc în sânge. In circuitul secundar, limfocitele au sansa întâlnirii cu antigenul specific receptorului lor, se activeaza, prolifereaza si se diferentiaza spre stadiile de *celule efectoare* si *celule cu memorie*.

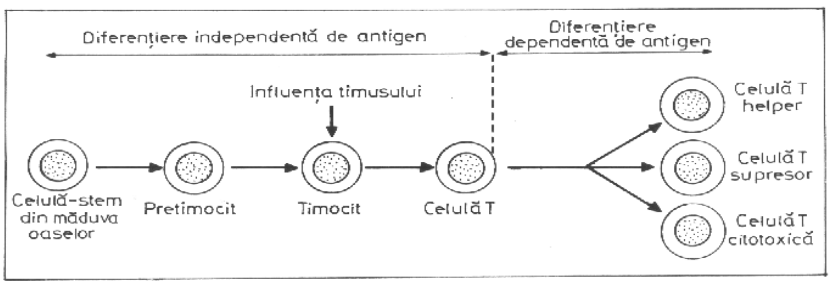


Fig. 35. *Diferentierea limfocitelor* are loc în doua etape: 1) diferentierea independenta de antigen în maduva osoasa si în organele limfoide primare; 2) diferentierea

dependenta de antigen în organele limfoide secundare.

Mecanismele moleculare care conditioneaza migrarea limfocitelor din splina si ficat, în organele limfoide primare, nu se cunosc. Este un proces aleatoriu sau este programat de receptori celulari, eventual dobânditi în aceste organe. Daca este un proces conditionat, înseamna ca în ficat, celulele limfoide sunt deja pre-B (prebursocite) si vor migra în bursa lui Fabricius si respectiv pre-T (pretimocite), care vor migra în timus.

Rolul bursei lui Fabricius în diferentierea limfocitelor B

Bursa lui Fabricius este un organ *limfoepitelial* si se dezvolta ca un diverticul dorsal al intestinului terminal, situat lânga cloaca. Primordiul bursal se observa la embrionul de 4 zile de incubatie, ca un mugure epitelial în regiunea cloacala. Pe masura ce creste, mugurele se vacuolizeaza si vacuolele prin coalescenta, formeaza lumenul bursal. Pe suprafata interna a cavitatii bursale, epiteliul formeaza pliuri longitudinale, prolifereaza si constituie aglomerari celulare (muguri epiteliali) în lamina propria. Formarea mugurilor epiteliali este dependenta de interactiunea celulelor epiteliale cu tesutul mezenhimal. Celulele stem limfoide din sacul vitelin colonizeaza mugurele epitelial în zilele 8-11 de dezvoltare embrionara. Fiecare mugure epitelial este colonizat de 1-3 celule stem limfoide prebursale. Celulele limfoide prolifereaza intens si formeaza medula foliculilor bursali.

Atât celulele epiteliale ale bursei cât si celulele stem ale liniei limfoide prolifereaza intens în cursul vietii embrionare, dar si 2-4 saptamâni dupa ecloziune. La 4 saptamâni dupa ecloziune, bursa contine circa 10 000 de foliculi, fiecare având circa 10^5 limfocite.

Celulele stem limfoide prebursale sunt originare în *mezenhimul* embrionar. Înainte de a ajunge în bursa, genele pentru sinteza imunoglobulinelor s-au rearanjat, fiind angajate în dezvoltarea pe linia B. La 12 zile de incubare, în interiorul bursei apar celule care exprima IgM membranar, iar la ecloziune, circa 90% din celulele bursale au IgM pe suprafata lor si sub 1% exprima IgG sau IgA.

Celulele epiteliale din zona medulara formeaza o retea laxa, având o structura interna de tip secretor. In zona medulara, pe lânga celulele epiteliale se gasesc limfocite, plasmocite, fagocite. Regiunea medulara si cea corticala sunt separate prin membrana bazala. La suprafata lumenului bursal, celulele epiteliale se diferentiaza în epiteliul asociat foliculului, cu functia de a fagocita si de a transporta materialul antigenic, din lumenul bursal, în regiunea medulara. Celulele epiteliale

din epiteliul asociat foliculilor si cele din medula bursala sunt diferite în privinta capacitatii de a fagocita si a activitatii enzimatice.

La ecloziune, bursa are 30-40 mg, atinge dezvoltarea maxima (3-4 g) la 2-4 luni si se mentine pâna la 4-6 luni, când începe sa involueze si se atrofiaza la maturitatea sexuala, când dispar complet structurile limfoide si epiteliale.

Bursectomia la ecloziune nu împiedica migrarea limfocitelor B la periferie, pentru ca procesul începe timpuriu în dezvoltarea embrionara. Îndepartarea chirurgicala a primordiului sau ablatia chimica a epiteliului bursal prin tratament cu testosteron, se poate face la 2-5 zile de incubare, înainte ca foliculii bursali sa fie populati de celulele stem limfoide. La pasarea adulta timectomizata, numarul de limfocite B în organele limfoide periferice nu este influentat. Se gasesc plasmocite si anticorpi, dar cu un repertoriu foarte limitat al specificitatii de legare, ceea ce denota o maturare extrabursala foarte limitata a limfocitelor B. Concluzia este ca bursa lui Fabricius nu este strict necesara pentru asamblarea genelor codificatoare ale sintezei imunoglobulinelor si nici pentru diferentierea limfocitelor B, dar are un rol esential pentru *diversificarea clonala* a limfocitelor B, adica pentru diversificarea repertoriului lor antigenic.

Bursa lui Fabricius este un organ limfoid specializat în care se produce diversificarea somatica extensiva a genelor rearanjate pentru sinteza anticorpilor, cât si expansiunea clonala a limfocitelor.

Spre deosebire de mamifere, la care generarea diversitatii celor circa 10^9 specificitati de legare a anticorpilor se face prin legarea combinatoriala a segmentelor genice V-D-J (pentru catena H) si a segmentelor genice V-J (pentru catena L), linia aviana de evolutie a vertebratelor a exploatat o alta strategie pentru generarea diversitatii specificitatii de legare a moleculelor de anticorpi. In timpul dezvoltarii embrionare a puiului de gaina, potentialul generarii diversitatii genetice prin procese de recombinare genica este limitat, deoarece regiunea variabila a catenei H si a catenei L este codificata de secvente genice functionale unice V si J. Conversia genica are loc cu o rata mare între *singura gena functionala* V (VH_1 sau VL_1) si *un grup de pseudogene* V. De aceea, rearanjarea genelor în celulele embrionare ale liniei limfoide, înainte de migrarea în bursa, va produce o diversitate foarte limitata a specificitatii de legare a anticorpilor. Micromediul bursal selecteaza si favorizeaza diferentierea celulelor stem bursale care sufera o conversie genica productiva, iar celelalte (circa 90%), probabil cu conversie neproductiva, mor prin *apoptoza* în interiorul bursei.

Între celulele epiteliale ale bursei si celulele liniei limfoide se

stabilesc interactiuni foarte strânse, esentiale pentru diversificarea specificitatii antigenice a limfocitelor B. Efectul bursei este mediat de factori humorali, ca de exemplu, *bursopoetina*, un polipeptid mic, capabil sa induca diferentierea limfocitelor B *in vitro*.

Diferentierea limfocitelor B la mamifere

Diferentierea liniei celulare B este ulterioara diferentierii liniilor eritrocitara si mieloida.

La mamifere, primul organ în care are loc diferentierea celulelor B, este *ficatul fetal*. Initial, ficatul primeste celule precursoare ale liniei limfoide generate în *sacul vitelin*, dar ulterior el însusi devine sediul functiei hematopoetice. Aceiasi functie de stimulare a diferentierii limfocitelor B ar avea-o *splina fetala* si chiar *sângele circulant*, care strabatând diferite organe dobândeste capacitatea de a induce maturarea limfocitelor B.

Studiul diferentierii limfocitelor B în ficatul fetal este îngreunat, deoarece ficatul nu se poate extirpa (asa cum se pot extirpa timusul si bursa lui Fabricius), iar numarul limfocitelor este mic comparativ cu al celulelor liniei eritrocitare.

Celulele precursoare ale liniei B generate în ficatul embrionar si ulterior în maduva osoasa, nu exprima markeri imunoglobulinici de suprafata. Ele îsi dobândesc competenta imunitara în *maduva, în ficat sau în splina*. Maturarea (dobândirea competentei) consta în exprimarea receptorului imunoglobulinic membranar. In genomul lor are loc rearanjarea genelor V, D, J ale catenei H. Odata cu rearanjarea genica, limfocitele sufera o tranzitie rapida si devin limfoblaste mari, care se divid. Prin diviziune rezulta celule pre-B mici, care exprima catena μ în citoplasma, dar nu exprima Ig de membrana (μ cit$^+$, L$^-$, Igm$^-$). Ulterior se rearanjeaza genele k ale catenei L si numai daca genele k nu se rearanjeaza cu succes, se recombina genele λ. Dupa sinteza catenei L, moleculele de imunoglobulina se exprima pe suprafata limfocitului.

Rearanjarea într-o combinatie functionala a genelor unuia din cei doi cromosomi, împiedica recombinarea genelor în cromosomul pereche, sugerând o explicatie pentru fenomenul excluderii alelice.

Prima imunoglobulina de suprafata a limfocitelor B este IgM, ca proteina integrata, cu o densitate de peste 200 000 de molecule/celula. Limfocitele B care exprima pe suprafata lor numai molecule IgM sunt considerate imature. Alaturi de IgM pot sa coexiste IgA sau IgG. Pe masura ce diferentierea limfocitelor B progreseaza, alaturi de IgM apare IgD, care treptat devine dominanta cantitativ. Limfocitele B mature, în repaus (neangajate) au pe suprafata lor, nivele mai înalte de IgD decât IgM. Acestea sunt celule *imunocompetente*.

Limfocitele B care nu reusesc sa genereze o rearanjare

functionala a genelor pentru sinteza catenelor H si L, sunt eliminate într-un stadiu timpuriu al diferentierii lor.

Dupa stimularea antigenica, limfocitele B mature secreta IgM, IgG (una din subclase), IgA sau IgE. Nu se diferentiaza o linie celulara care sa sintetizeze izotipul IgD.

Timusul la mamifere si rolul lui în diferentierea limfocitelor T

Timusul este un organ limfoid voluminos, asezat în partea superioara a mediastinului anterior. Are origine epiteliala dubla: deriva din *ectodermul* perechii a III-a de pungi branhiale si din *endodermul* celei de III-a pungi faringiene. Primordiile epiteliale fuzioneaza si formeaza primordiul timic epitelial, care pierde legatura cu faringele si lumenul dispare.

Timusul este primul organ limfoid care apare la pasari si mamifere. Primordiul timic este strapuns de *celulele stem limfoide* (la soarece, în ziua a 11-a de dezvoltare embrionara), cu originea în sacul vitelin. Ulterior în cursul dezvoltarii fetale, celulele limfoide vin din ficat, iar dupa nastere, din maduva osoasa. La fatul uman, la 20 de saptamâni de sarcina, timusul este dezvoltat complet.

Arhitectura timusului

Timusul este alcatuit din doi *lobi*. Fiecare lob este împartit incomplet, prin septuri conjunctive, în *lobuli*. Lobulii contin o retea de *celule epiteliale*, printre care sunt diseminate numeroase *celule limfoide* (timocite).

Epiteliul timic este diferentiat zonal: zona *corticala* si zona *medulara.*

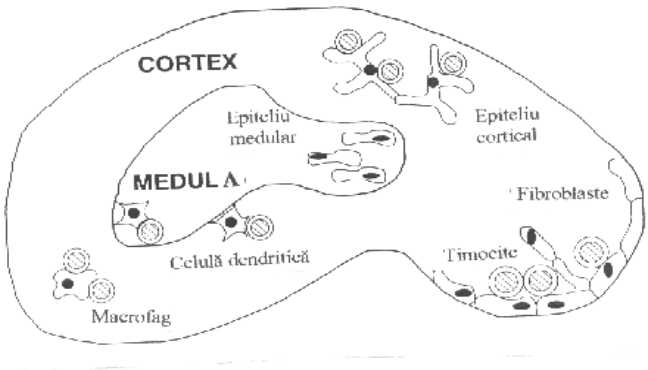


Fig. 36. Componentele *stromale* ale micromediului timic.

La animalele tinere, zona *corticala* formeaza 80% din tesutul timic. Celulele *epiteliale* sunt de forma stelata, cu numeroase prelungiri fine care se interconecteaza, formând un *citoreticulum*. Numarul limfocitelor este mai mare decât al celulelor epiteliale. Limfocitele sunt mici si pe sectiunile colorate cu hematoxilina, zona corticala este întunecata, datorita raportului nucleo-citoplasmatic înalt al limfocitelor imature. Majoritatea limfocitelor(80-85%) sunt imature, *dublu pozitive* (exprima nivele înalte ale moleculelor CD_4 si CD_8) si au un nivel scazut de molecule RCT. Ele stau în ochiurile unei retele de celule epiteliale si celule dendritice care exprima molecule CMH. Moleculele CMH au rol esential în selectia pozitiva a limfocitelor, adica maturarea lor în celule T mature. O mica proportie a limfocitelor sunt blaste.

Zona *medulara* este formata dintr-o retea densa de celule epiteliale mai mari, de forma ovoida, cu prelungiri citoplasmatice scurte, bogate în organite secretoare. În ochiurile retelei se gaseste un amestec de limfocite cu un singur marker, CD_4^+ sau CD_8^+, dar exprima RCT α-β, cu o densitate net superioara. Raportul celulelor CD_4^+/CD_8^+ este 2/1. Limfocitele sunt situate printre *celulele prezentatoare de antigen* (celule dendritice, interdigitate si macrofage). Un numar mic (sub 1%) de limfocite timice exprima RCT γ-δ, diseminate în cortex si medula.

În zona medulara apar doua tipuri de structuri, derivate din celule epiteliale: *corpusculii Hassal* formati din celule epiteliale dispuse concentric, cu aspect general de degenerescenta si *cavitatile chistice*, captusite de celule epiteliale columnare prevazute cu microvili.

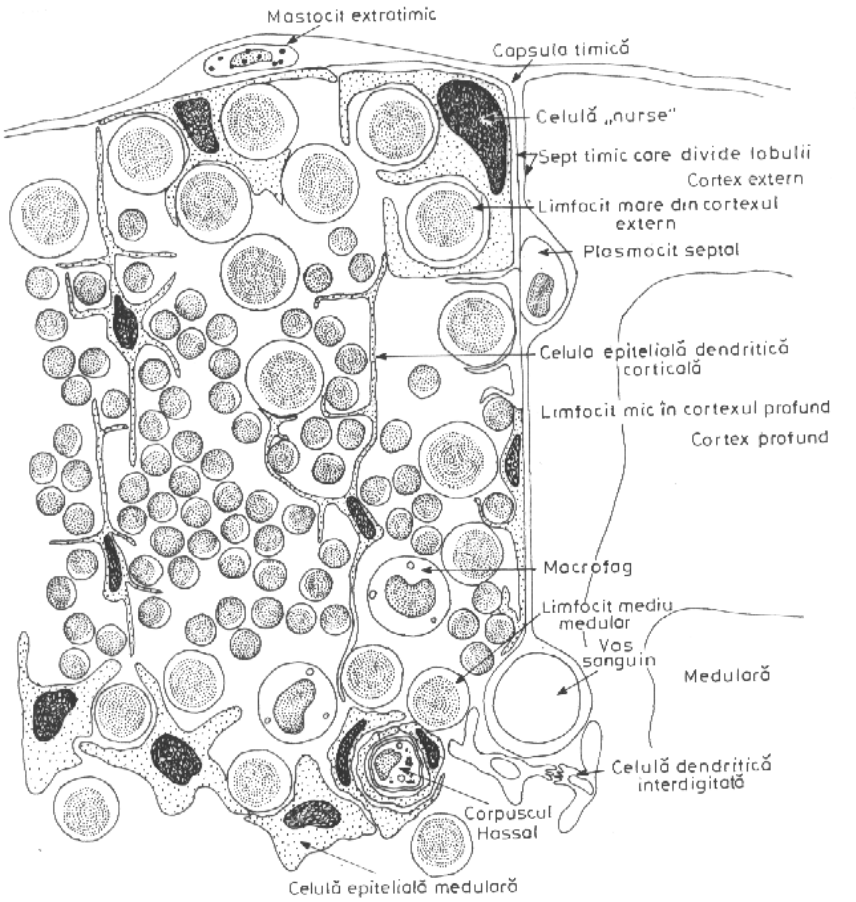


Fig. 37. Reprezentare schematica a *arhitecturii* generale a *timusului*. Subregiunile timusului sunt prezentate în dreapta figurii, iar constituientii lor celulari, în stânga (dupa Hood si colab., 1984).

Timusul este bogat inervat, cu fibre adrenergice si colinergice, iar neurotransmitatorii oxitocina, vasopresina si neurofizina sunt sintetizati endogen de celulele perivasculare medulare si de celulele “nurse”(celule epiteliale mari, asociate cu un numar mare de limfocite), ceea ce sugereaza raporturile strânse ale timusului cu sistemul nervos.

În raport cu distributia limfocitelor, timusul are 4 regiuni functionale:

– *regiunea subcapsulara*, bogata în limfocite imature (pre-T), abia

intrate în timus;

– *cortexul timic*, în care limfocitele se divid cu o rata înalta;

– *jonctiunea cortico-medulara,* formata dintr-un cordon de macrofage “santinela”, cu rolul unei site celulare;

– *regiunea medulara*, cu relativ putine limfocite, care poarta markerii de suprafata proprii limfocitelor mature.

Timusul evolueaza, atingând adeseori o dezvoltare maxima odata cu maturitatea sexuala, dupa care începe involutia, asociata cu sensibilitatea sa la hormonii steroizi. La soarece, involutia începe la 6 saptamâni. La om, involutia timica începe dupa pubertate, tesutul reducându-se cu circa 3% pe an, pâna la 35-40 de ani si cu 1% pe an dupa aceea. Dimensiunile nu se reduc, deoarece tesutul timic este înlocuit de tesut gras.

Atrofia glandei timice poate fi accelerata de *corticosteroizi*. Producerea unor cantitati crescute de corticosteroizi sau terapia cu corticosteroizi accelereaza atrofia timica. Fenomenul se numeste *involutie de stress*, pentru ca nivelul de corticosteroizi creste în starile de stress si în cele clinice. Steroizii au actiune citolitica asupra timocitelor corticale. Limfocitele medulare sunt relativ rezistente, datorita enzimei 20 α-hidroxil steroid-dehidrogenazei.

Maturarea limfocitelor T în timus

Dezvoltarea repertoriului limfocitelor T, este un proces complex de evenimente de selectie pozitiva si negativa, ce implica interactiunea moleculelor de suprafata si necesita influenta micromediului timic. Limfocitele T au raporturi spatiale strânse cu celulele stromale epiteliale. Acestea furnizeaza "semnale educationale" care orienteaza maturarea limfocitelor în doua directii:

– dobândirea RCT si a capacitatii de a recunoaste antigenele exogene;

– dobândirea tolerantei fata de self;

– eliminarea celulelor T self-reactive, precum si a celor care nu genereaza combinatia genica a unui receptor functional.

Celulele pre-T se diferentiaza în ficatul fetal si în maduva osoasa. Ele contin o enzima specifica - *terminal deoxynucleotidil-transferaza*

(TdT) - cu localizare nucleara. In cortexul timic, limfocitele pre-T exprima markerii CD_2 si CD_3 pe membrana citoplasmatica. Pe masura ce maturarea progreseaza, limfocitele fiind înca în *cortexul timic*, exprima markerii CD_4 si CD_8. Dupa expresia la mica densitate a moleculelor CD_4 si CD_8, se rearanjeaza genele care codifica RCT si celulele devin triplu pozitive(RCT^+, CD_4^+, CD_8^+). Acestea sufera procesele de selectie, prin care se elimina celulele T autoreactive si se selecteaza celulele care recunosc moleculele CMH I si CMH II. Când limfocitul T imatur migreaza în *zona medulara*, se pierde fie markerul CD_4, fie CD_8. În acest stadiu dispare markerul TdT.

Celulele CD_4^+ si CD_8^+ se dezvolta din celule progenitoare dublu pozitive pentru cei doi markeri, iar acestea îsi au originea în celule dublu negative.

Dobândirea tolerantei fata de self. În zona corticala a timusului, limfocitele "învata" sa tolereze selful, fenomen ce consta în selectia celulelor care recunosc moleculele CMH exprimate pe suprafata celulelor epiteliale. Aproximativ 90% dintre celulele pre-T care ajung în zona corticala, nu reusesc sa traverseze jonctiunea cortico-medulara. Ele sunt supuse unui proces de *selectie pozitiva* ce consta în supravietuirea limfocitelor care recunosc moleculele CMH ale celulelor epiteliale. Selectia pozitiva consta în supravietuirea limfocitelor care recunosc si interactioneaza cu *afinitate medie*, cu moleculele CMH. Limfocitele care nu genereaza un receptor care sa recunoasca moleculele CMH, ca si cele care leaga cu mare afinitate moleculele CMH, potential inductoare ale conflictelor autoimune (selectie negativa), sunt eliminate prin apoptoza.

În zona *medulara*, selectia limfocitelor continua, prin *eliminarea clonelor reactive fata de self*. Medula timica are particularitati functionale proprii, care favorizeaza inducerea tolerantei fata de self. In contrast cu cortexul, medula este *deschisa circulatiei libere a proteinelor* de origine sanguina si în structura ei se gasesc CPA (celule prezentatoare de antigen) originare în maduva osoasa (macrofage, celule dendritice, si interdigitate). Aceasta semnifica faptul ca moleculele self din sânge ajung în timus si induc toleranta celulelor T imature. Moleculele self care nu intra în sânge (de exemplu, moleculele tisulare), nu ajung în timus si nu induc selectia negativa. Fata de aceste molecule este posibila întreruperea starii de toleranta.

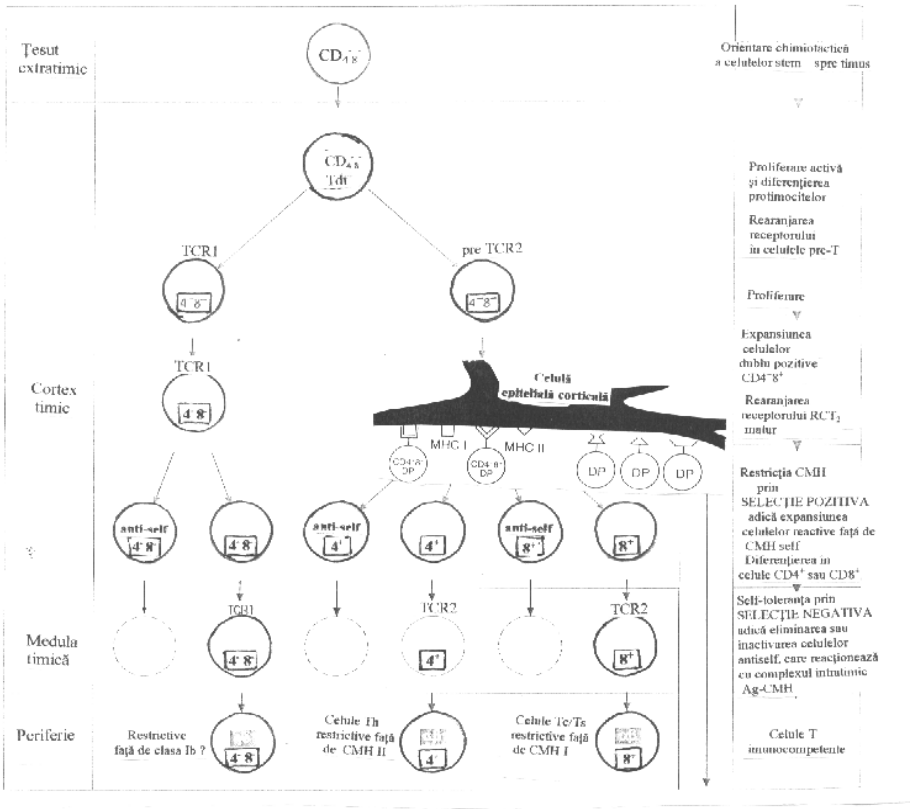

Țesut extratimic
Cortex timic
Medula timică
Periferie
Orientare chimiotactică a celulelor stem spre timus
Proliferare activă și diferențierea protimocitelor
Rearanjarea receptorului în celulele pre-T
Proliferare
Expansiunea celulelor dublu pozitive CD4+8+
Rearanjarea receptorului RCT2 matur
Celulă epitelială corticală
MHC I
MHC II
Restricția CMH prin SELECȚIE POZITIVĂ adică expansiunea celulelor reactive față de CMH self
Diferențierea în celule CD4+ sau CD8+
Self-toleranța prin SELECȚIE NEGATIVĂ adică eliminarea sau inactivarea celulelor antiself, care reacționează cu complexul intratimic Ag-CMH
Celule T imunocompetente
anti-self
TCR1
TCR2
pre TCR2
Restrictive față de clasa Ib ?
Celule Th restrictive față de CMH II
Celule Tc/Ts restrictive față de CMH I

Fig. 38. Diferentierea celulelor T în timus. Celulele autoreactive cu specificitate pentru antigenele self neexprimate în timus, pot sa devina tolerante prin contactul extratimic cu antigenele. TCR_1 = receptor γ, δ; pre-TCR_2 = receptor pre-T α, β; TCR_2 = receptor matur α, β; TdT = terminal deoxinucleotidil transferaza (dupa Roitt, 1997, modificata).

Prin *selectie negativa*, în zona *medulara*, sunt eliminate limfocitele T self-reactive, adica cele cu potentialul de a se activa fata de *antigenele self asociate moleculelor CMH*. Eliminarea acestor celule este esentiala pentru inducerea tolerantei fata de self. Sunt de asemenea eliminate celulele T care nu genereaza o combinatie genica pentru codificarea unui receptor functional de antigen. Se matureaza limfocitele care genereaza receptori specifici fata de epitopii nonself.

Selectia *negativa* este dependenta de cantitatea de antigen ce ajunge în timus. De exemplu, un antigen abundent (albumina) realizeaza o concentratie mare în timus si determina o selectie negativa completa, adica elimina întregul spectru de limfocite T – cu receptori de

înalta si joasa afinitate. De aceea, toleranta fata de albumina nu va fi niciodata întrerupta si nu se cunosc maladii autoimune cu reactivitate limfocitara fata de albumina. Alte molecule patrund în timus, în cantitati mici, pe cale sanguina(de exemplu, insulina) si selectia negativa este incompleta, adica sunt eliminate numai celulele T cu receptor de mare afinitate pentru antigen. In conditii experimentale, prin injectarea antigenului la concentratii mari, toleranta fata de aceste molecule poate fi întrerupta si se poate stimula reactivitatea autoimuna.

Se considera ca exprimarea RCT si a moleculei CD_4, ce interactioneaza cu moleculele CMH II, inhiba exprimarea moleculelor CD_8, sau diferentierea celulelor cu un singur marker(CD_4 ori CD_8) este un proces stochastic.

Rezultatul final al diferentierii limfocitelor T în timus, consta în generarea receptorilor celulelor T, cu capacitatea de a tolera *selful*, asociat cu moleculele CMH, si de a reactiona la moleculele nonself, ceea ce este esential pentru interactiunile celulare în cursul elaborarii raspunsului imun.

Numarul celulelor T mature în organele limfoide secundare ramâne constant, la o valoare ridicata, în conditiile în care timusul involueaza treptat. Constanta numerica a celulelor T este atribuita duratei lungi de viata a acestor limfocite, dar nu este exclusa producerea *de novo* în alte tesuturi (intestin, ficat, maduva osoasa).

Factorii celulari si humorali ai diferentierii limfocitelor

Pe baza datelor experimentale acumulate se poate deduce existenta a cel putin doua mecanisme active asupra diferentierii limfocitelor în organele limfoide centrale. Mecanismele propuse nu se exclud. Coexistenta si sinergismul lor demonstreaza importanta organelor limfoide centrale în controlul procesului de diferentiere si complexitatea acestuia. Majoritatea cercetarilor au vizat factorii de diferentiere ai timusului, dar rezultatele pot fi extrapolate asupra factorilor bursali ai diferentierii limfocitelor B la pasari.

S-au conturat doua ipoteze referitoare la factorii de diferentiere ai limfocitelor: ipoteza *celulara* si ipoteza *hormonala* (humorala).

În acord cu ipoteza celulara a micromediului epitelial al timusului, diferentierea limfocitelor T s-ar realiza prin contactul direct al pretimocitelor cu epiteliul timic. Experientele de extirpare a timusului la animalele nou nascute, cu sistem imunitar imatur au evidentiat ca prezenta timusului functional este o conditie esentiala pentru functia optima a imunitatii mediate celular. Extirparea timusului la animalele nou-nascute este urmata de instalarea “sindromului de epuizare”(Miller, 1961), ale carui simptome se manifesta progresiv mai intens si în esenta reflecta incapacitatea organismului de a se apara fata de infectiile virale

si fungice (disfunctia imunitatii mediate celular). Grefa timusului (de la organisme singenice) le restabileste treptat starea normala.

Extirparea timusului la organisme mature a evidentiat ca absenta timusului este compatibila cu viata, fara manifestarea unor deficiente notabile. S-a dedus astfel, ca mecanismele celulare de contact al limfocitelor cu celulele epiteliului timic ar fi active numai în primele faze ale maturarii limfocitelor T, dar absolut necesare pentru diferentierea lor.

Dupa datele actuale, mecanismul celular al influentei timice nu este suficient pentru diferentierea celulelor T. S-a emis ipoteza *hormonala*, care considera ca procesul de diferentiere si maturare imunitara ar continua dupa ce timocitele parasesc timusul. Hormonul secretat de celulele epiteliului timic ar exercita o actiune stimulatoare asupra diferentierii limfocitelor, atât intratimic cât si la distanta, dupa trecerea sa în circulatie, asupra celulelor limfoide circulante sau localizate în organele limfoide secundare, continuând astfel influenta directa a epiteliului timic.

În favoarea existentei unui factor hormonal timic s-au adus argumente experimentale, care pot fi grupate în doua categorii:

a) *Experiente de restabilire a functiei imunitare* sub actiunea factorilor timici: de exemplu, îndepartarea timusului la soarecele nou-nascut este urmata de pierderea imunitatii mediate celular. Implantarea subtegumentara a unei grefe de timus, plasata într-o camera speciala cu pereti porosi, permeabila pentru molecule, dar impermeabila pentru celule, restabileste imunocompetenta, ceea ce demonstreaza ca nu este strict necesar contactul limfocitelor cu celulele epiteliului timic. Este suficient ca mediatorul (mediatorii) chimic secretat de timus sa fie prezent în organism pentru a se produce maturarea limfocitelor T. Pe de alta parte, soarecii-femele timectomizate la nastere, îsi recapata competenta imunitara în timpul sarcinii, sub influenta hormonilor timici fetali, care trec în circulatia materna.

b) *Evidentierea factorilor timici* prin metode biochimice: unii hormoni au fost izolati din timus, iar altii din sânge. Nu sunt întru-totul asemanatori hormonilor conventionali, pentru ca nu se pot substitui complet tesutului timic si pentru faptul ca unele molecule din categoria hormonilor timici pot fi generate si în alte tesuturi. Factorii serici de origine timica dispar dupa timectomie si reapar dupa grefa de timus. Existenta factorilor serici de origine timica argumenteaza în favoarea ipotezei ca imunocompetenta se dobândeste atât în faza timica a limfocitelor, cât si la distanta, dupa ce limfocitele au parasit timusul.

Denumirea factorilor de imunocompetenta variaza mult, în functie de origine, proprietati biochimice, efecte biologice.

Din timusul de vitel s-au extras câteva polipeptide, iar unele s-au preparat pe cale sintetica. O serie de componente manifesta activitate imunobiologica: timulina, timopoetina, timozinele.

Timozinele (evidentiate de Goldstein) din cea de 5-a fractie proteica de extract timic de vitel, reprezinta un grup de polipeptide cu greutatea moleculara cuprinsa între 1000 si 15 000 D, stabile la 80°. Prin combinarea metodelor analitice de cromatografie analitica si gel-filtrare, din aceasta fractie s-au izolat 16 polipeptide. Ele induc, *in vitro*, sinteza MIF de catre limfocite, precum si diferentierea celulelor formatoare de anticorpi. De asemenea, timozinele restabilesc functiile imunitare la animalele timectomizate neonatal si la persoanele vârstnice, la care competenta imunitara diminua datorita involutiei timusului. Din acest amestec de polipeptide, cel mai activ este un polipeptid de 108 aminoacizi (12 kD), a carui secventa a fost determinata.

Timopoetina este un hormon polipeptidic al timusului de vitel, izolat de Goldstein, format din 49 de aminoacizi, evidentiat în primul rând datorita efectelor sale asupra transmiterii neuromusculare si mai putin prin efectele sale asupra sistemului imunitar. Bolnavii atinsi de *myasthenia gravis* prezinta, de regula, o hiperplazie timica (timom). S-a creat sistemul experimental al acestei maladii, ceea ce a permis izolarea unui polipeptid care modifica transmiterea neuromusculara, iar la indivizii bolnavi provoaca oboseala musculara. S-au identificat doua variante de timopoetina, care difera prin doi aminoacizi si stimuleaza activitatea limfocitelor T.

Timulina (Factorul timic seric, FTS) s-a izolat din serul uman, din serul de porc si din timusul de vitel. In acord cu criteriile clasice ale endocrinologiei si fiziologiei, timulina este singurul polipeptid de origine timica recunoscut ca hormon, adica este secretata si reglata de timus.

Timulina lipseste în serul soarecelui nud, iar la animalele conventionale, dispare dupa timectomie, dar reapare dupa grefa timica. Este un peptid cu greutatea moleculara de 900 D, cu urmatoarea secventa a celor 9 aminoacizi: Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn. Concentratia FTS depinde de vârsta si scade odata cu scaderea greutatii timusului. Timulina are activitate biologica numai când este cuplata equimolar cu Zn. Echilibrul Zn este alterat la vârstnici.

Se pare ca hormonii timici actioneaza asupra limfocitelor T, dupa ce acestea au parasit timusul. Efectul lor stimulator se exercita asupra tuturor categoriilor functionale de limfocite T: helper, citotoxice, supresoare.

Ubiquitina este un polipeptid ce contine 74 de aminoacizi (8,4 kD) care se gaseste în timus si în majoritatea tesuturilor la animale si chiar la plante. *In vitro*, stimuleaza diferentierea limfocitelor precursoare ale liniei T si B, ceea ce explica pastrarea functiei imunitare dupa timectomizarea animalelor mature.

Organele limfoide secundare (periferice)

Sistemul limfatic, alcatuit din *vasele limfatice, limfa si organele limfoide secundare*, este parte integranta a sistemului vascular sanguin al veretebratelor, dar la mamifere are rol esential în transportul si distributia antigenelor, anticorpilor si a celulelor imunocompetente. Celulele tumorale se disemineaza (metastazeaza) frecvent pe cale limfatica.

Functia primara a sistemului limfatic este de a colecta lichidul proteic interstitial, care rezulta prin extravazarea continua la nivelul capilarelor sanguine si de a-l readuce în sistemul vascular sanguin, mentinând astfel constanta volumului plasmei sanguine circulante.

La originea sistemului limfatic se gasesc *capilarele limfatice*, delimitate de o membrana bazala subtire, de care sunt atasate lax celulele endoteliale. Prin asezarea lor, aceste celule au rolul unor valve, care favorizeaza intrarea limfei în capilar si limiteaza iesirea. Membrana bazala este continua si este înconjurata de fibre musculare netede. Invelisul muscular al vaselor limfatice manifesta contractii ritmice intrinsece, care genereaza o presiune de câtiva mm Hg, favorizând circulatia limfei.

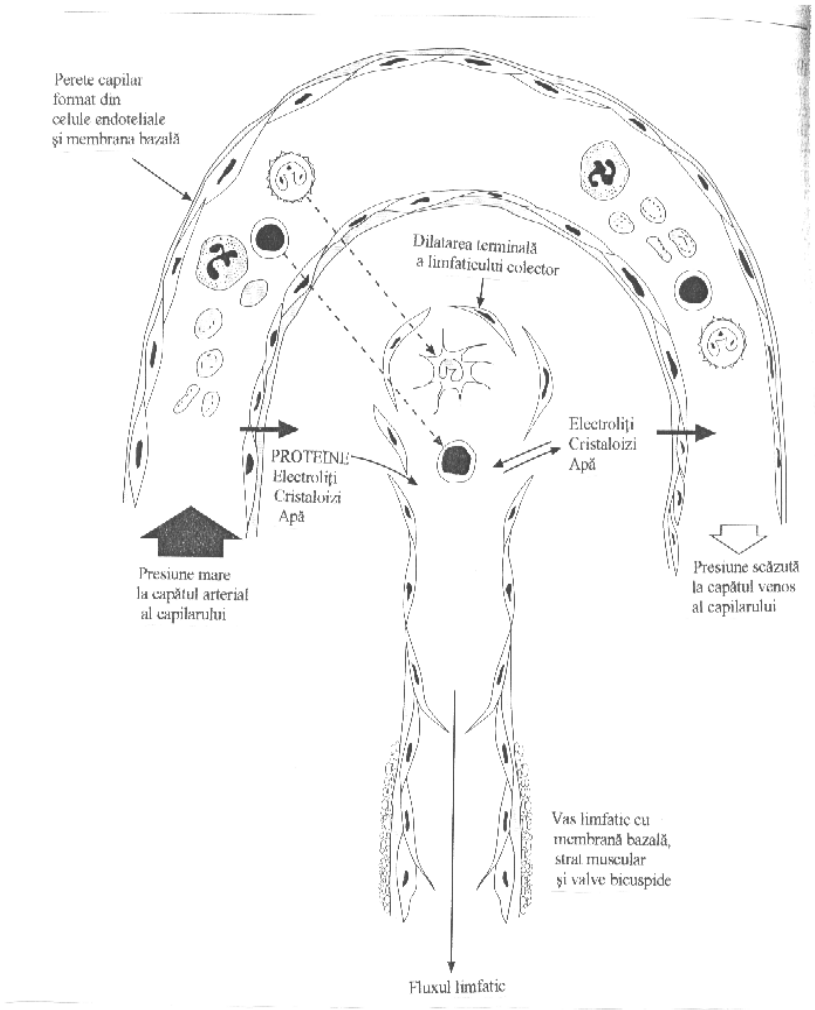


Fig. 39. *Principiul formarii limfei*. Presiunea hidrostatica la capatul arterial al capilarului determina iesirea fluidului proteic prin peretele capilar. La capatul venos, presiunea hidrostatica este mica si presiunea coloid-osmotica a proteinelor plasmatice determina reintrarea apei, electrolitilor si cristaloizilor în circulatie. Proteinele nu pot fi reabsorbite si împreuna cu o parte a apei si sarurilor, sunt drenate prin limfa. Diametrul capilarului permite trecerea hematiilor, iar leucocitele, fiind mai mari, trebuie sa se deformeze. Aceasta creeaza o rezistenta la curgere, ceea ce determina o cadere a presiunii între capatul arterial si cel venos al capilarului (dupa Hall,1998).

Confluenta capilarelor limfatice formeaza vase mai mari, prevazute cu numeroase valve bicuspide ce împiedica curgerea gravitationala a limfei.

Limfa mamiferelor poate fi compartimentata în limfa *periferica*, *intermediara* si *centrala*.

Limfa periferica (cea care nu a trecut printr-un ganglion limfatic) are un continut scazut de celule albe (sub 1000/mm^3), de dimensiuni mici, din care circa 85% sunt celule T si circa 10% sunt celule cu voal.

Limfa intermediara (din segmentul vascular în care se gasesc ganglionii limfatici) contine un numar mare de limfocite mici (20 000/mm^3), dintre care 75% sunt limfocite T care au extravazat la nivelul venulelor postcapilare din ganglioni.

Limfa centrala se gaseste în vasele limfatice în aval de ganglioni, ce se unesc pentru a forma trunchiurile limfatice mari (intestinal, toracic, ductul limfatic drept, ductul cervical).

La mamifere, pe traseul vaselor limfatice care transporta limfa de la periferie spre marile vene de la baza gâtului, se gasesc *ganglionii limfatici*.

Sistemul limfoid este alcatuit din *limfocite*, ca element celular esential si din *organele limfoide primare si secundare*.

Organele limfoide secundare reprezinta suportul anatomic al raspunsului imun si sunt reprezentate de urmatoarele tipuri de structuri:

– ganglionii limfatici, splina, tesuturi limfoide organizate asociate cu suprafetele mucoase (tonsile, placi Peyer, tesutul limfoid asociat mucoasei gastrointestinale(GALT), respiratorii (BALT);

– altele sunt formatiuni limfoide difuze, reprezentate de aglomerari de diferite categorii de celule în care predomina limfocitele, asociate cu tractul gastrointestinal, respirator si urogenital.

Tesuturile limfoide au localizari strategice, la portile de intrare a antigenelor în organism: tegumentul sau mucoasele. Aici se gasesc aglomerari de limfocite si celule care transporta si prezinta antigenele. Ele interactioneaza functional, pentru a capta si neutraliza materialele nonself.

Organele limfoide secundare au urmatoarele particularitati functionale:

– sunt populate tardiv cu limfocite care si-au dobândit competenta functionala în organele limfoide primare;

– la nivelul lor, limfopoeza este diminuata sau inexistenta;

– la nivelul capilarelor care le iriga, limfocitele parasesc fluxul sanguin;

– extirparea lor totala este imposibila, datorita caracterului difuz;

distincte: *aria celulelor T* contine un numar mic de limfocite B, dar are un numar mare de celule dendritice, cu rolul de a prezenta antigenele pentru activarea limfocitelor T si B; *aria celulelor B* contine în principal *foliculi primari*, ce reprezinta situsurile în care limfocitele B activate, prolifereaza si formeaza *centrii germinali*, înainte de a se diferentia în celule producatoare de anticorpi si celule de memorie;

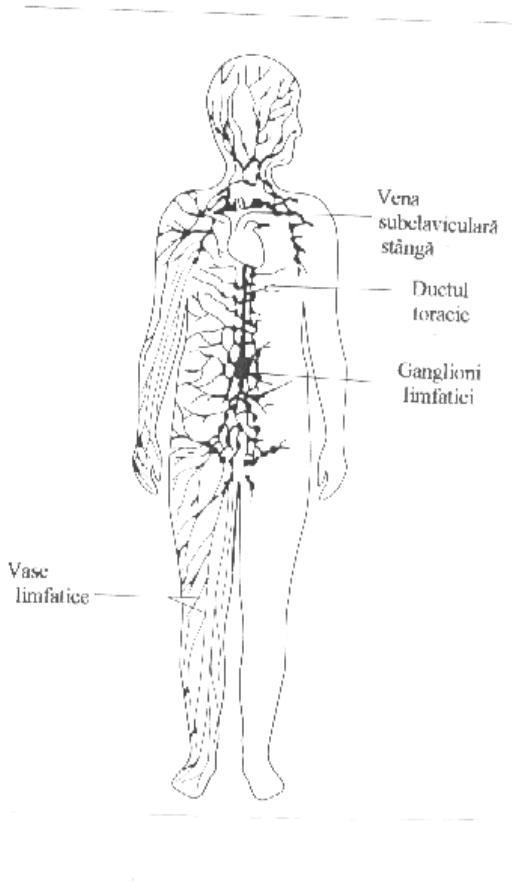


Fig. 40. Reteaua *ganglionilor limfatici*.

Aglomerarea celu-lelor cu functie imuna în tesuturi limfoide secun-dare mareste eficienta reactivitatii imunitare prin distributia limfocitelor T si B în arii ce favorizeaza interactiunea lor cu celu-lele care prezinta anti-genul si prin caracterul de retea, care permite circulatia limfocitelor în ariile în care antigenele sunt concentrate.

Ganglionii limfatici

Ganglionii lim-fatici sunt organe lim-foide secundare, situate în grupuri pe traseul vaselor limfatice care dreneaza ariile super-ficiale ale pielii sau viscerele, cu dimensiuni de la câtiva mm pâna la 1cm. Suprafata lor este acoperita cu o *capsula conjunctiva* din care pornesc numeroase trabecule ce strabat parenchimul ganglionar. Capsula este formata din tesut colagenic dens. In structura ganglionului limfatic se distinge *stroma*, formata din *fibre* si *celule reticulare*. Celulele reticulare sunt fibroblaste mari, ramificate, care produc fibre reticulare. In ochiurile retelei se gasesc celule limfoide, macrofage, vase limfatice si sanguine, care formeaza parenchimul ganglionar.

Ganglionii limfatici au o vascularizatie dubla: limfatica si sanguina. Limfa este adusa în ganglion prin cele 5-8 *vase limfatice aferente*, care se varsa în *sinusul subcapsular*. De aici, printre trabeculele conjunctive, pornesc radiar *sinusurile corticale*, care ulterior devin *sinusuri medulare*. Acestea se continua cu *vasele limfatice eferente*.

Parenchimul ganglionar are o structura diferentiata zonal. Se disting zona *corticala* si cea *medulara.*

Zona corticala este divizata în doua subzone:

– *corticala externa* foarte bogata în limfocite B;

– *corticala profunda* (paracorticala), populata de limfocite T (la soarecele nud – atimic- corticala profunda este atrofiata).

În subzona *corticala externa* se gasesc numeroase aglomerari de limfocite, denumite *foliculi limfoizi primari*, formati în special din limfocite mici. Au diametrul de circa 1 mm si sunt distribuiti printre limfocitele dispersate uniform. Foliculii primari sunt formati din limfocite B mici, mature, neangajate, împachetate strâns. O componenta nelimfoida importanta a foliculilor primari o constituie aglomerarile de *celule foliculare dendritice*(CFD). Prin receptorii lor pentru complement si pentru Fc, CFD concentreaza complexele imune în aria limfocitelor B.

Dupa stimularea antigenica, în timpul elaborarii raspunsului imun, foliculii primari devin *foliculi limfoizi secundari*, datorita proliferarii celulare intense, cu o zona centrala formata din celule limfoide mai mari (celule B de memorie), macrofage si celule foliculare dendritice, denumita *centru germinativ*. Centrul germinativ este sediul proliferarii celulare intense dupa stimularea antigenica.

Subzona *corticala profunda* (paracortex) este o arie limfoida situata sub cortex, între foliculi si zona medulara. Limfocitele si limfoblastele sunt dense, iar celulele prezentatoare de antigen (în

special celule interdigitate, celule cu voal) sunt diseminate printre limfocite. Paracortexul este o arie T-dependenta, limfociteleT în repaus si activate fiind majoritare. Intern fata de paracortex sunt *cordoanele medulare*, populate cu macrofage si plasmocite, care duc spre *sinsul medular*. Unitatea functionala a paracortexului este *cordonul paracortical*, care se întinde de la baza foliculului, pâna la cordonul medular subiacent. Cordonul paracortical are un diametru de 100-1000 μm si este spatiul în care celulele dendritice prezinta antigenul, rarelor clone de limfocite T specifice si favorizeaza activarea lor.

Zona *medulara* contine tesut limfoid dens, sub forma unor *cordoane* asezate printre sinusurile medulare. In cordoane predomina limfocitele B producatoare de anticorpi (plasmablaste si plasmocite mature), asociate cu macrofage, celule T. Sinusurile limfatice sunt captusite cu celule, a caror suprafata apicala prezinta denivelari care încetinesc percolarea limfei prin ganglion.

Antigenele care au penetrat barierele protectoare de suprafata ajung în ganglionii limfatici prin vasele limfatice aferente. Macrofagele care captusesc sinusurile limfatice, preiau antigenele si le transfera zonelor T-dependenta si T-independenta, unde sunt recunoscute de limfocitele care au receptori specifici. Stimularea limfocitelor din foliculii primari, de catre antigenele T-independente, induce dezvoltarea *foliculilor secundari*, cu formarea centrilor germinali în care se gasesc si sunt retinute limfocitele B de memorie. Celulele B activate de antigen, migreaza în cordoanele medulare si se diferentiaza în plasmocite producatoare de anticorpi. Anticorpii parasesc ganglionul limfatic prin vasul limfatic eferent.

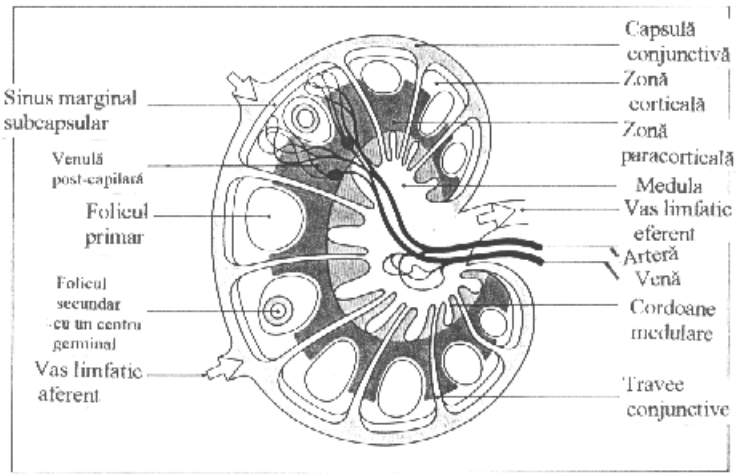


Fig. 41. Structura unui ganglion limfatic. Sub capsula conjunctiva se gaseste sinusul subcapsular, tapetat cu celule fagocitare. Limfocitele si antigenele patrund în ganglion prin vasele limfatice aferente. Cortexul contine aglomerari de limfocite B (*foliculi limfoizi)*. Majoritatea foliculilor poseda un focar de celule proliferante, denumit *centru germinativ*. Zona paracorticala contine, în esenta, limfocite T, majoritatea fiind în contact cu *celule interdigitate*, prezentatoare de antigen. Fiecare ganglion are o vascularizatie arteriala si venoasa proprie. Limfocitele circulante intra în ganglion la nivelul endoteliului specializat al venulelor post-capilare ale zonei paracorticale. Medula contine limfocite T si B si majoritatea plasmocitelor organizate în cordoane. Limfocitele parasesc ganglionul numai prin vasul limfatic eferent.

Antigenele T-dependente ajung în ganglioni odata cu limfa aferenta, fiind transportate de celulele cu voal în zona paracorticala. Activarea si proliferarea celulelor T produc cresterea în volum a ariei T-dependente.

Sângele circula în directie opusa limfei. *Artera aferenta* patrunde în ganglion la nivelul hilului si se continua cu *arteriolele*, care formeaza un bogat *plex capilar*. La nivelul cortexului profund, din plexul capilar se formeaza *venulele postcapilare cu endoteliu înalt*. La acest nivel, limfocitele parasesc circulatia sanguina prin celulele endoteliale si se distribuie în zonele caracteristice: limfocitele B – în cortexul extern, iar limfocitele T – în cortexul profund (paracortex). Dupa ce strabat lent teritoriile ganglionare specifice, limfocitele trec în zona medulara. Aici se colecteaza sinusurile limfatice medulare, care dreneaza limfa spre vasele limfatice eferente. Limfocitele parasesc ganglionul prin vasele limfatice eferente.

Circulatia lenta a sângelui în vasele din ganglionul limfatic, permite

unui numar mare de limfocite sa treaca din sânge în limfa, unde pot întâlni antigenul corespunzator. Se mareste astfel sansa ca un numar mic de limfocite imunocompetente sa întâlneasca antigenul specific si sa reactioneze proliferativ.

Organizarea ganglionului limfatic trebuie sa favorizeze interactiunile dintre antigene si limfocite. Ganglionii contin numeroase celule capabile sa prelucreze si sa prezinte antigenele: macrofage, celule dendritice, celule interdigitate si celule cu voal. In ganglioni, populatia celulara se reînoieste continuu, prin traficul celulelor limfoide si al celulelor accesorii

Functiile ganglionului limfatic sunt urmatoarele:

– filtrarea limfei si epurarea componentelor nonself (celule bacteriene, toxine etc.) de catre fagocitele ganglionare;

– este suportul material al proliferarii limfocitelor si al sintezei anticorpilor, dupa stimularea antigenica. Limfa eferenta este filtrata si îmbogatita în anticorpi si în limfocite.

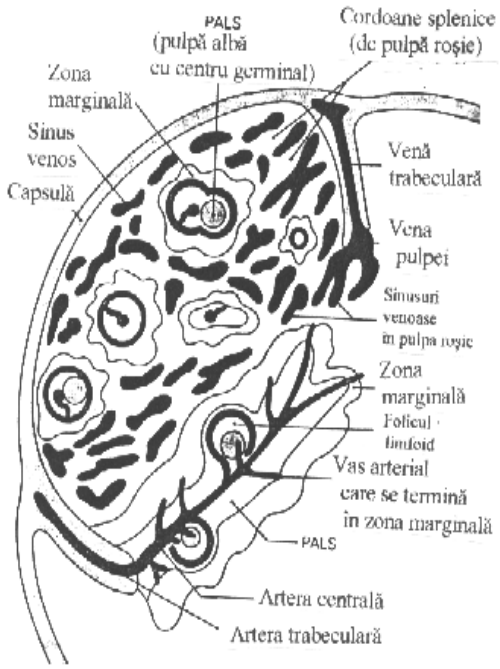


Fig. 42. Structura splinei. Splina este alcatuita din pulpa rosie si pulpa alba. Pulpa rosie înconjura ariile pulpei albe. Pulpa alba contine foliculi primari si centrii germinativi, ca si în ganglionul limfatic.

Dupa stimularea antigenica inductoare a raspunsului imun mediat humoral, în subzona corticala externa (a celulelor B) se produc ample modificari citologice, iar dupa administrarea unui antigen timodependent, modificarile citologice apar si în subzona corticala profunda (a celulelor T).

Splina

Splina este cel mai mare organ limfoid, cu rol important în functia imunitara. Splina este acoperita de o capsula conjunctiva, cu putine fibre musculare si incapabila de contractii ample, de la care porneste o retea de trabecule conjunctive, ce împart tesutul splenic în com-partimente comunicante. În fiecare compartiment se gasesc *pulpa alba* si *pulpa rosie*, sprijinita pe tesutul conjunctiv reticular .

În trabeculele conjunctive se gasesc arterele trabeculare (ramificatii ale arterei splenice). Când ating diametrul de circa 200 μm, arterele parasesc trabeculele conjunctive si patrund în parenchimul splenic. Ele dau ramificatii laterale (arteriole), fiecare arteriola fiind acoperita de un *manson* dens de tesut limfoid. In jurul arteriolei se gasesc limfocite, distribuite într-o stroma conjunctiva, ce formeaza *teci limfoide periarteriolare* (PALS = periarteriolar lymphoid sheats) sau *mansoane coaxiale de limfocite*, în jurul arteriolelor. Arteriola are o pozitie centrala în *mansonul limfoid*.

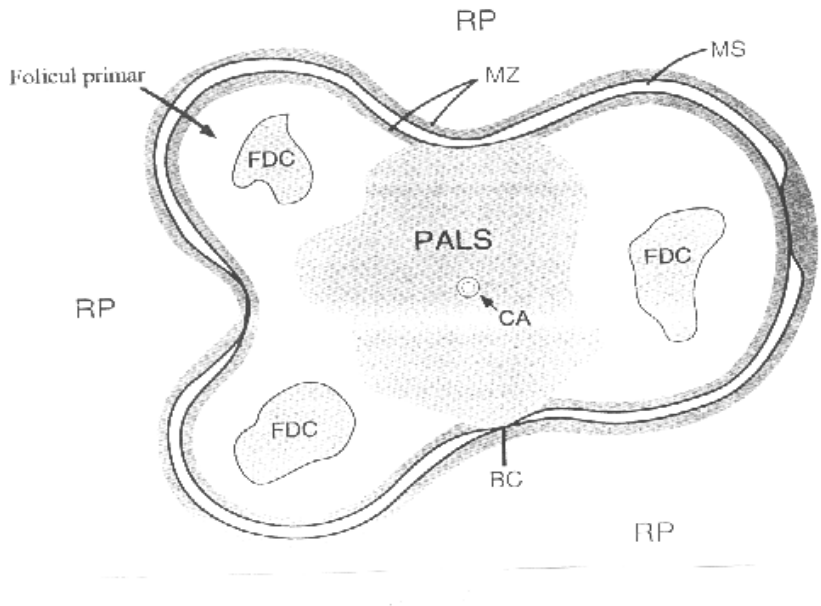


Fig. 43. Structura pulpei albe a splinei. Pulpa alba este împartita într-o zona centrala bogata în celule T – teaca limfoida periarteriolara (PALS) – înconjurata de foliculi primari care contin celule B. In fiecare folicul primar se gaseste o aglomerare de celule foliculare dendritice (FDC). Pulpa alba este separata de pulpa rosie (RP) prin sinusul marginal (MS). Sinusul marginal este inclus într-un strat de limfocite ale zonei marginale (MZ). Adiacente sinusului marginal sunt macrofagele metalofile, care se crede ca au rol important în reglarea traficului în spatiile pulpei rosii si albe. Canalele colapsate (CC) par a fi ariile prin care limfocitele intra si ies din pulpa alba.

CA = arteriola centrala.

Totalitatea tecilor periarteriolare (mansoane limfoide coaxiale) formeaza *pulpa alba a splinei*. Mansoanele au o zona interna, bogata în limfocite T si o zona externa bogata în limfocite B, grupate în aglomerari denumite *foliculi*. Limfocitele pulpei albe se vad pe sectiunea tesutului ca zone alb-cenusii, înconjurate de pulpa rosie.

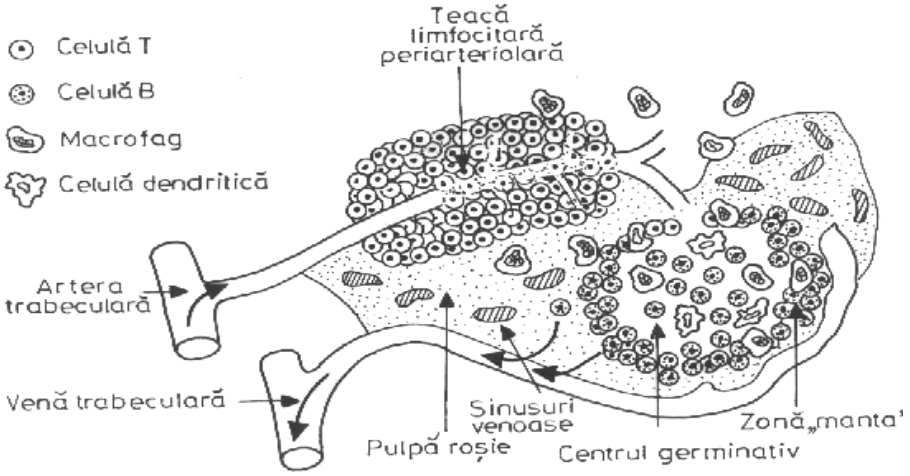


Fig. 44. *Topografia regiunilor* timo-dependente (TD) si timo-independente (TI) în splina. Teaca limfocitara periarteriolara constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi si tesutul limfoid adiacent reprezinta zona TI.

Unele arteriole, dupa iesirea din mansonul limfoid (pulpa alba) dau numeroase ramificatii "în perie", denumite *arteriole penicilate*, care patrund în *pulpa rosie*.

Pulpa rosie înconjura pulpa alba si este formata din cordoane de tesut splenic (cordoane Bilroth) situate printre sinusurile venoase. Unele capilare arteriale se pot conecta cu sinusurile venoase, dar majoritatea arteriolelor penicilate se deschid în cordoanele Bilroth (circulatie deschisa). Sinusurile venoase sunt canale vasculare, delimitate de endoteliu si o membrana bazala. Endoteliul este perforat de spatii poligonale mari, asezate ordonat.

Cordoanele Bilroth sunt formate dintr-o retea tridimensionala de *celule reticulare si fibre reticulare*, care formeaza o unitate functionala cu adventicea sinusurilor. In aceasta retea se deplaseaza celulele splenice libere cu functie fagocitara (macrofage). Cordoanele Bilroth comunica cu sistemul venos al splinei.

Splina este un filtru al sângelui, legat pe o derivatie a marii circulatii.

La nivelul cordoanelor Bilroth, circulatia are caracter "deschis", deoarece sângele vine în contact direct cu celulele splenice. In ochiurile cordoanelor Bilroth se gasesc *sinusurile*. Ele sunt capilare cu diametrul

fagocita antigenele particulate. In sinusuri se deschide o parte din arteriolele penicilate (circulatie închisa).

Macrofagele din peretele sinusurilor si din cordoanele de tesut splenic retin si capteaza hematiile îmbatrânite si plachetele. Macrofagele exprima receptori pentru Fc al IgG, astfel ca elementele figurate tapetate cu IgG (autoanticorpi) sunt fagocitate. Prin îmbatrânire, eritrocitele îsi pierd *acidul sialic* de pe suprafata, expunând manoza si galactoza, care sunt recunoscute de celulele splenice.

Alte arteriole, dupa iesirea din mansonul limfoid se termina în *sinusul zonei marginale*, care se deschide într-un sinus venos al pulpei rosii. Zona marginala consta dintr-o retea fina de fibre reticulare, în ochiurile careia se gasesc limfocite B. Sinusul marginal este adiacent foliculilor limfatici si consta din spatii vasculare aplatizate, ce se continua cu sinusurile pulpei rosii. Peretele sau este foarte permeabil si permite trecerea limfocitelor din sânge în pulpa alba (în teaca periarteriolara). Sinusul zonei marginale formeaza granita dintre pulpa alba si pulpa rosie si reprezinta *zona de schimb celular* dintre cele doua compartimente. Din pulpa alba, limfocitele trec în sinusurile marginale, apoi în sinusurile pulpei rosii si de aici în sistemul venos al splinei.

În pulpa alba se gasesc *foliculii limfoizi primari*. Ei sunt localizati la periferia tecii limfoide periarteriolare sau în imediata ei vecinatate. In mansoanele limfoide periarteriolare, limfocitele au o distributie selectiva: celulele T segrega predominant în tecile periarteriolare, iar celulele B, în foliculii limfoizi.

Antigenele din sânge sunt preluate de macrofagele zonei marginale si ajung în pulpa alba. Sinteza anticorpilor fata de antigenele circulante este una din functiile majore ale splinei. Celulele B activate în pulpa alba, migreaza în pulpa rosie, unde se gaseste majoritatea plasmocitelor. In zona marginala se gaseste majoritatea celulelor NK.

Splina nu are circulatie limfatica. La nivelul splinei, limfocitele ies din sânge prin peretele capilarelor zonei marginale, care este foarte permeabil si se distribuie în pulpa alba, iar de aici strabat drumul invers si ajung în pulpa rosie, în sinusurile venoase. Acestea comunica atât cu capilarele zonei marginale, cât si cu sistemul venos al splinei.

Limfocitele parasesc splina prin vena splenica.

Sistemul imunitar al mucoaselor

Mucoasele (digestiva, respiratorie, genitala, urinara), din punctul de vedere al contactului cu antigenele, constituie structurile cele mai vulnerabile ale organismului uman si animal. In special la nivelul intestinului, contactul permanent cu microorganismele creeaza conditiile patrunderii acestora în mediul intern. Mucoasele reprezinta nu numai o entitate anatomica, ci si una functionala imunologic. Particularitatile lor

structurale si functionale tind sa le delimiteze tot mai mult de aparatul imunitar sistemic.

Sistemul imunitar al mucoaselor, la mamifere, este o retea integrata de tesuturi, formate din celule specifice, celule limfoide si molecule cu functie imunitara, protectoare fata de infectiile pe calea membranelor mucoase. La nivelul structurilor de contact cu antigenele, sistemul imunitar al mucoaselor este divizat anatomic si functional: structurile BALT(*b*ronchus *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue) si GALT(*g*ut *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue). La rozatoare, structurile BALT sunt bine dezvoltate, având rolul de a raspunde la antigenele inhalate. La om, structurile BALT propriu-zise nu se dezvolta, iar tesuturile limfoide majore echivalente sunt *tonsilele palatine* si formatiunile *adenoide* (tonsilele nazofaringiene). Impreuna, ele formeaza o bariera fizica de tesuturi limfoide, care constituie *inelul Waldeyer*. Tonsilele si adenoidele se descriu ca NALT (*n*asal *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue). Structurile limfoide asociate mucoaselor (MALT) includ câteva categorii de celule antigen-reactive: celule B, pozitive pentru moleculele CMH II, macrofage, celule Langerhans, celule dendritice, celule foliculare dendritice, plasmocite. Aceste celule sunt fie distribuite difuz, fie organizate în structuri anatomice distincte: foliculi limfoizi, placile Peyer, amigdalele.

Amigdalele (tonsilele palatine) sunt asezate în unghiurile mandibulare. Dimensiunile unei amigdale masoara 2,5 cm lungime, 1,5 cm latime si 1 cm grosime. Tonsilele si adenoidele sunt singurele structuri limfoide asociate tractului digestiv, acoperite de o capsula care adera intim de tesutul limfoid subiacent. Pe fata interna (care priveste spre vestibulul faringian) se gasesc deschiderile *criptelor tonsilare*. Criptele patrund adânc în masa limfoida a tonsilei, usurând contactul celulelor reactive (macrofage si limfocite), cu antigenele care patrund pe care digestiva si respiratorie. Circa 50% dintre celulele tonsilare sunt limfocite B, constituite în foliculi care contin centrii germinali. Majoritatea limfocitelor B au ca receptor de antigen IgG, iar restul sunt IgM^+ si IgA^+. Circa 40% din celulele tonsilare sunt limfocite T.

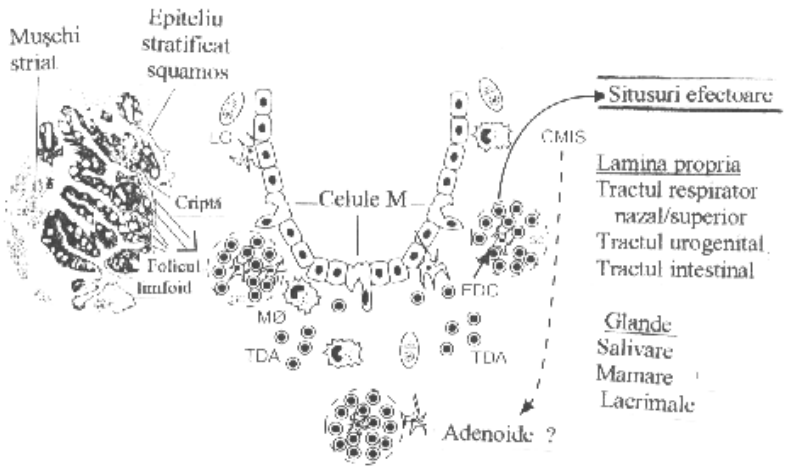


Fig. 45. Rolul potential al NALT pentru dezvoltarea *imunitatii mucoaselor*. Tonsila palatina prezinta cripte adânci. Schema ilustreaza categoriile majore de celulele prezentatoare de antigen, (LC = celule Langerhans, Mf = macrofage; FDC = celule foliculare dendritice), centrul germinativ al celulelor B si ariile parafoliculare cu celule T (TDA). Limfocitele efectoare si cele de memorie recircula pe calea sistemului imunitar comun al mucoaselor (dupa McGhee, 1998).

Apendicele este o structura limfoida asociata intestinului, prezenta numai la iepure, maimute antropoide si la om. Prezinta structuri limfoide cu organizare similara placilor Peyer, cu un dom bine definit, aglomerari de celule B organizate în foliculi si arii interfoliculare bogate în celule T. Epiteliul domului este permeabil, permitând trecerea libera a antigenelor solubile si a celor particulate, ca si a bacteriilor.

Foliculii limfoizi sunt structuri asociate, caracteristice mucoasei intestinale, care se gasesc fie ca *foliculi solitari* de 0,5-2,0 mm, foarte numerosi în partea terminala a ileonului, fie ca *foliculi agregati* ce formeaza *placile Peyer*. Foliculii (solitari sau agregati) sunt localizati în corionul mucoasei, dar patrund si în submucoasa.

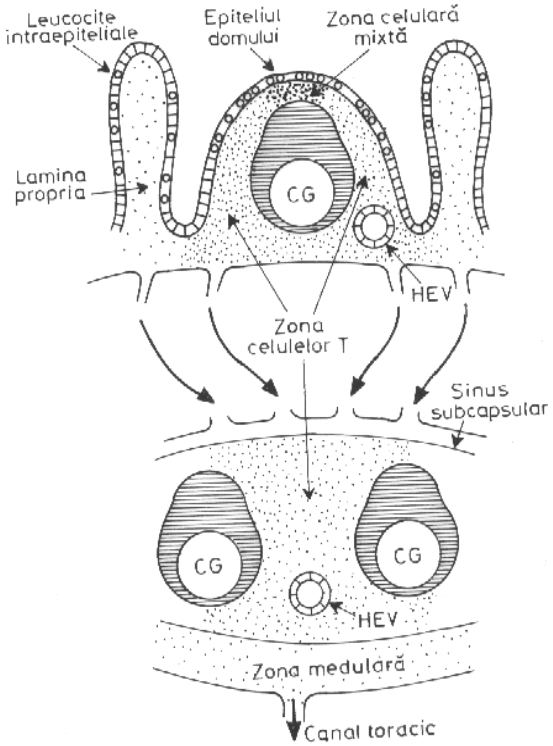


Fig. 46. Structura schematica a unei *placi Peyer* si a unui *ganglion mezenteric*. HEV = venule cu endoteliu înalt; CG = centru germinativ.

O *placa Peyer* contine 20-30 de foliculi agregati. Are forma circulara sau alungita (eliptica), cu axul mare orientat în lungul intestinului. Sunt mai numeroase în ileonul terminal. Lungimea este variabila, între 1-12 cm, iar latimea, între 0,8-1cm. Placile Peyer ocupa marginea libera a intestinului(niciodata marginea mezenterica). Ele se formeaza în cursul dezvoltarii fetale, ating nu-marul maxim la pubertate (peste 200) si scad încet cu vârsta. Se estimeaza ca 10% din celulele limfoide umane sunt asociate cu structurile limfoide ale tractului gastro-intestinal

Fiecare folicul al placii Peyer este format dintr-o aglomerare de macrofage, limfocite, plasmocite. Ariile interfo-liculare sunt bogate în limfocite T. Structura foli-culara individualizata este separata de lumenul intes-tinal prin structuri speci-alizate, denumite *domuri*: *domul epitelial*, alcatuit din celule epiteliale dife-rentiate, de aspect cubo-idal, ale mucoasei intes-tinale si *domul conjunctiv* subepitelial.

La nivelul domului, epiteliul intestinal prezinta putine celule mucoase si putini microvili, dar exista în schimb, o categorie de celule specializate functional, denumite *celule M* (membraneous), atasate de enterocite prin complexe jonctionale. Prezenta vimentinei si cheratinei în celulele M este dovada originii lor epiteliale. La nivel microscopic, celulele M se recunosc prin asocierea lor strânsa cu limfocitele intraepiteliale. Ele au pliuri membranare mari, bazolaterale, în care stau limfocitele intraepiteliale. Celulele M formeaza o "umbrela" deasupra unui spatiu în care se gasesc limfocite intraepiteliale, macrofage, celule dendritice.

Celulele M au rolul de a pinocita antigenele solubile din lumenul intestinal, dar preiau si antigene particulate(virusuri, bacterii, protozoare). Inglobarea antigenului nu este urmata de degradare lizosomala, ci antigenul intact este transportat în vezicule spre membrana laterobazala. Prin fuziune, antigenul este eliberat în spatiul laterobazal, unde este transferat celulelor subiacente, unele specializate în prelucrarea si prezentarea antigenelor, fenomen denumit *translocatie*. Antigenele sunt prelucrate în celulele dendritice si în macrofagele subepiteliale si sunt prezentate limfocitelor locale sau sunt transferate celulelor interdigitate si prezentate celulelor T interfoliculare. Celulele interdigitate care prezinta antigenul, deriva din celulele dendritice care au înglobat antigenul.

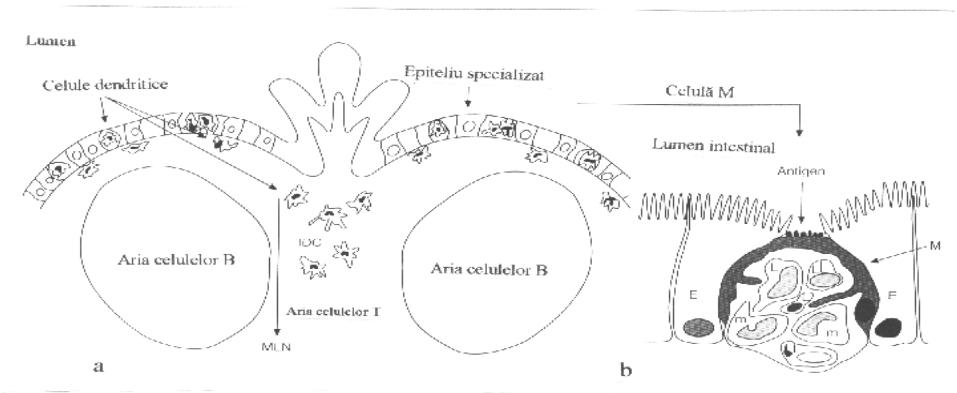


Fig. 47. **a**. *O placa Peyer*. **b**. Reprezentarea schematica a mecanismului functional al placii Peyer. Detaliu al celulei M. Dupa înglobarea si transportul de catre celula M, antigenul este prelucrat de macrofage sau de celulele dendritice, care se transforma în celule interdigitate (IDC) si apoi este prezentat limfocitelor în ariile celulelor T ale placii Peyer si ale ganglionilor limfatici mezenterici (MLN). E = enterocit; L= limfocit; m= macrofag/celula dendritica (dupa Sminia, 1998).

O placa Peyer are 3 regiuni structurale: domul, foliculii cu centrii germinali (zona celulelor B) si aria parafoliculara(populata de celulele T, în special celule Th). Placile Peyer sunt populate initial de limfocite T. Dezvoltarea centrilor germinali(ai limfocitelor B) este dependenta de antigenele microbiotei intestinale, pentru ca la animalele germ-free, placile Peyer sunt slab dezvoltate si lipsesc centrii germinali. La organismele timectomizate neonatal si la cele congenital atimice, ariile interfoliculare sunt sarace în limfocite T. Pentru completa dezvoltare a placilor Peyer, sunt necesare atât influentele stimulatoare ale timusului, cât si contactul cu microbiota intestinala.

Structurile limfoide asociate tractului digestiv sunt lipsite de învelisul capsular si de vasele limfatice aferente. In lipsa vaselor limfatice, lichidul interstitial care scalda structurile limfoide îndeplineste functia limfei aferente.

Limfocitele foliculare au raporturi de vecinatate cu epiteliul si de aceea se numesc foliculi asociati epiteliului. Foliculul limfoid, ca unitate structurala a placii Peyer, este strapuns de o arteriola ascendenta, ce se termina într-o retea capilara situata sub epiteliul folicular. Aceste capilare se continua cu venulele postcapilare din ariile interfoliculare T-dependente.

Limfocitele libere, diseminate în mucoasa tractului digestiv au distributie difuza. Ele se gasesc în lamina propria si în stratul epitelial al mucoasei, printre enterocite. Este o populatie heterogena de limfocite: cele din lamina propria sunt în proportii egale limfocite T si B, dar si un numar mare de plasmocite. In mucoasa intestinala se gasesc limfocite B, cu markerul IgE^+ , numarul lor fiind crescut la persoanele cu alergii alimentare. In submucoasa gastrointestinala, în special în vecinatatea vaselor de sânge, se gasesc mastocite cu receptori de mare afinitate pentru IgE.

Limfocitele intraepiteliale sunt în special limfocite T citotoxice(75%) si limfocite B, cu markerul IgA^+. Majoritatea limfocitelor B sunt în curs de diferentiere spre plasmocite. Ele sunt primele care recunosc antigenele luminale ce traverseaza mucoasa pe o cale independenta de celulele M. Limfocitele T intraepiteliale mediaza hipersensibilitatea întârziata cu specificitate de antigen si au functie citotoxica.

Celulele limfoide din structurile organizate(placile Peyer) sunt neangajate. Ele au rolul de a initia raspunsul imun, dupa interactiunea cu antigenele care traverseaza celulele M. Limfocitele difuze din lamina propria sunt în mare parte activate, având functia de a produce IgA.

Functiile MALT. Sistemul imunitar al mucoaselor are o

functionalitate precisa: sa excluda antigenele exogene, înainte ca ele sa patrunda în mediul intern si sa evite sau sa minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic, la antigenele moleculare sau celulare care tind sa patrunda în mediul intern. In acelasi timp, tesutul limfoid asociat mucoaselor trebuie sa ramâna insensibil la microbiota normala a mucoaselor. MALT are calitatea de "zona de control" a organismului, la contactul cu antigenele, dar are si rol reglator asupra functionalitatii aparatului imunitar sistemic. Asa se explica faptul ca administrarea orala a unui antigen la om sau animale, în esenta, nu produce un raspuns imun sistemic, ci de obicei, un raspuns imun al mucoasei. Mecanismul nu este cunoscut, dar sistemul imunitar al mucoaselor împiedica raspunsul imun amplu al aparatului imunitar sistemic, la un numar foarte mare de antigene intestinale, în special de origine alimentara. Antigenele complexe bacteriene sau virale pot initia un raspuns imun complex, prin intermediul aparatului imunitar al mucoaselor. Deficientele functionale ale MALT expun organismul si aparatul imunitar sistemic, unei permanente stari de activare, care depaseste limitele fiziologice, consecinta fiind instalarea maladiilor autoimune.

Prin epiteliul folicular, microorganismele dobândesc acces la structurile limfoide ale foliculului. Consecinta este benefica, deoarece, astfel se initiaza raspunsul imun protector fata de microorganismele luminale. Din acest punct de vedere, celulele M formeaza un sistem de avertizare timpurie. Patrunderea microorganismelor la nivelul epiteliului folicular are si consecinte nefavorabile, deoarece acesta poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene (*S.typhi*), la structurile submucoase.

Limfocitele B din foliculii limfoizi ai placilor Peyer se gasesc într-o stare de proliferare activa. Totusi, numarul plasmocitelor este mic, ceea ce reflecta posibilitatea ca limfocitele B din structurile GALT, sa migreze în alte mucoase, înainte de a se diferentia în plasmocite.

Tabel comparativ privind principalele caracteriatici ale organelor limfoide primare si secundare

Caracteristici	Organe limfoide primare	Organe limfoide secundare
Originea	La zona de trecere între ectoderm si endoderm. Contin celule derivate din ectoderm din mezoderm (limfocite) .	In mezoderm
Momentul dezvol-tarii sau dupa nastere	Foarte timpuriu în viata embrionara	Tardiva în cursul vietii fetale
Rolul	Sunt populate timpuriu cu celule precursoare ale limfocitelor si au	Sunt populate tardiv numai de limfocite

	rol în dobândirea competentei imunitare a acestora.	mature.
Durata functiei lor	La adult sufera o involutie progresiva, care la vârstele înaintate este însotita de o deficienta a functiilor imunitare.	Persista toata durata vietii
Activitatea mitotica a limfocitelor	Este intensa si independenta de stimularea antigenica	Intensa numai dupa stimularea antigenica
Formarea centrilor germinativi de reactie	Absenta	Foarte intensa
Efectele extirparii precoce	Reducerea numarului de limfocite si diminuarea rapida a reactivitatii imunitare	Nu este posibila. Dupa blocarea imunitara diminua, dar totdeauna ramân celule imunocompetente.
Efectele extirparii tardive	Reducerea numarului de limfocite si limitarea reactivitaii imunitare	Imposibila
Functia esentiala	Centre de proliferare, maturare si diseminare a limfocitelor.	Focare ale raspunsului imun.

Recircularea limfocitelor

Fig. 48. Reprezentarea schematica a *circuitului global al limfocitelor*. (1) Limfoblastele din maduva ajung pe cale sanguina în splina si timus. Dupa maturare, limfocitele sunt eliberate în sânge. (2) Limfocitele mature intra în splina si o parasesc. (3) Limfocitele mature pot intra în structurile MALT si în tesuturile periferice. (4) Limfocitele parasesc MALT si tesutul periferic pe calea limfaticelor. (5) Limfocitele intra în ganglionul limfatic, trecând prin celulele specializate care captusesc venulele postcapilare. (6) Limfocitele parasesc ganglionul limfatic pe cale limfatica si reintra în sânge prin ductul toracic.

Organele limfoide *primare* (maduva oaselor, timusul, bursa lui Fabricius) au rolul de a produce limfocite mature neangajate (“virgine”). Dupa ce parasesc organele limfoide primare, limfocitele au proprietatea *constitutiva* de a recircula în *organele limfoide secundare* si în compartimentul *tertiar nelimfoid*, în absenta stimulului inflamator.

Organele limfoide secundare sunt reprezen-tate de ganglionii lim-fatici, de splina si de structurile MALT. Functia lor este de a acumula si prezenta antigenele, atât limfocitelor neangajate cât si celor de memorie.

Tesuturile nelimfoide ale *compartimentului tertiar* sunt reprezentate de restul tesuturilor organismului. In mod obisnuit, ele contin putine celule limfoide, dar în focarele de inflamatie se acumuleaza populatii limfocitare numeroase, în special limfocite de

memorie.

Tesutul limfoid secundar este suportul structural al reactiilor celulare ale raspunsului imun. La acest nivel se produce contactul limfocitelor cu antigenul specific. Faptul impune, ca o conditie functionala esentiala, *recircularea continua a limfocitelor* pentru a întâlni si a recunoaste antigenul. Din acest punct de vedere, limfocitele au o particularitate functionala unica: *parasesc* sângele ca si celulele mieloide (neutrofile, monocite), trec în organele limfoide secundare si în compartimentul tertiar, dar, spre deosebire de cele mieloide, *se reîntorc* în fluxul sanguin. Recircularea *sânge-tesuturi limfoide secundare-sânge* se repeta tot restul vietii limfocitelor si este independenta de stimularea antigenica. Milioane de limfocite trec zilnic prin fiecare organ limfoid secundar, astfel încât fiecare antigen patruns în organism pe o cale sau alta, va fi expus întregului repertoriu de receptori de antigen ai limfocitelor.

Capacitatea limfocitelor de a recunoaste si de a coloniza anumite tesuturi limfoide a fost denumita *ecotaxis* sau *homing.*

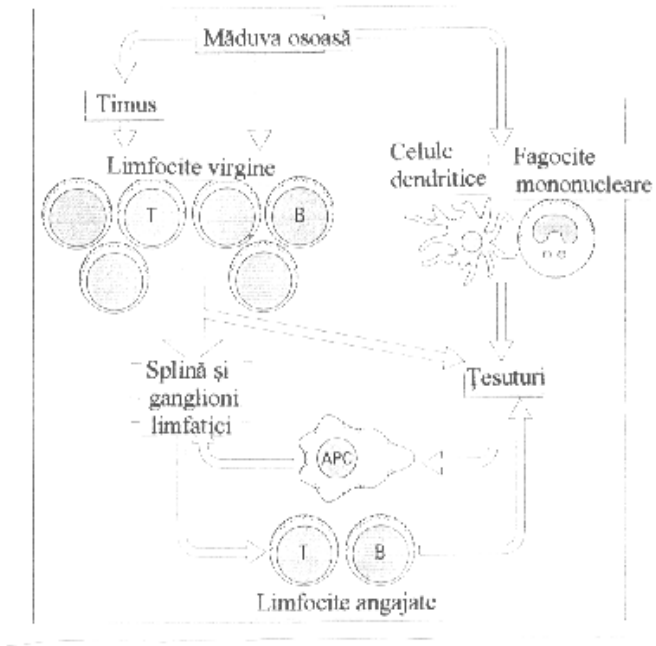


Fig. 49. *Recircularea limfocitelor* si a *celulelor prezentatoare de antigen*. Limfocitele neangajate parasesc timusul si migreaza în organele limfoide secundare (splina, ganglioni limfatici). Celulele prezentatoare de antigen (celulele dendritice si fagocitele

mononucleare), dupa ce parasesc maduva, trec în sânge, apoi intra în tesuturi, înglobeaza antigenul si îl transporta în tesuturile limfoide pentru a fi prezentat celulelor T si B. Limfocitele activate migreaza din tesuturile limfoide si se acumuleaza preferential la situsurile infectiei sau ale inflamatiei.

Mecanismele homing au un rol esential în mentinerea diviziunilor functionale ale organelor limfoide si în orientarea limfocitelor mature neangajate si a celor de memorie. Recircularea realizeaza dispersia populatiilor de limfocite efectoare si de memorie, spre ariile cele mai expuse invaziei antigenice, dar realizeaza si supravegherea tesuturilor în raport cu prezenta antigenelor.

Solutia naturala pentru aceasta functie a fost *compartimentarea* sistemului limfoid în organe individualizate si tesuturi care sunt conectate si unificate printr-un *trafic limfocitar* orientat si prin *recirculare*.

Recircularea limfocitelor este impusa de modul de organizare a sistemului limfoid: fiecare organ limfoid dreneaza un teritoriu definit al organismului. Astfel, antigenul injectat subcutan sau intradermic este transportat la ganglionii limfatici regionali. Antigenul injectat intravenos ajunge în splina, iar cele care patrund la nivelul mucoaselor (digestiva, respiratorie, genito-urinara) ajung la structurile limfoide MALT (GALT si BALT).

Limfocitele care recunosc antigenul la nivelul tesuturilor limfoide secundare, se activeaza si initiaza raspunsul imun, iar cele care nu au întâlnit antigenul specific, trec prin tesuturile limfoide în câteva ore, se reîntorc în sânge pentru câteva minute si îsi reiau un nou circuit.

Celulele limfoide mature (competente) se gasesc concentrate în organele limfoide secundare. Cele din sânge constituie numai o proportie mica din totalul limfocitelor.

Din totalul limfocitelor, numai o proportie foarte mica, (2%) recircula în unitatea de timp, pe traseul sânge – ganglioni limfatici – limfa – canal toracic – sânge, iar restul ramân în organele limfoide secundare.

Limfocitele cu cea mai înalta rata a rcircularii sunt celulele T de memorie. Limfocitele T si B neangajate (naive), recircula cu o rata mult mai scazuta între organele limfoide secundare, pâna întâlnesc antigenul sau mor. Cele care au întâlnit antigenul specific, se activeaza. Una din primele consecinte ale activarii este exprimarea intensa a unor molecule de suprafata, din categoria *integrinelor*, care mediaza aderenta ferma a limfocitului de componentele matricei extracelulare. Limfocitele care recunosc antigenul sunt *retinute selectiv* în organul limfoid secundar.

Efectul pe termen mai lung al stimularii antigenice este *expansiunea* clonala a limfocitelor si diferentierea lor în *celule efectoare*

ale raspunsului imun si *celule de memorie*. Aceste categorii au proprietati de migrare (homing) net diferite fata de limfocitele neangajate.

Limfocitele efectoare si cele de memorie dobândesc capacitatea de a migra în compartimentul tertiar (adica în organele nelimfoide). Pe de alta parte, ele manifesta o selectivitate pronuntata a compartimentului de homing, adica dupa activare, recircula preferential în formatiuni limfoide de aceiasi categorie cu cele care au fost activate la contactul primar cu antigenul.

Limfocitele T γ/δ recircula preferential în tesuturile epiteliale neinflamate.

Importanta fenomenului de homing. Fenomenul de homing este foarte important în procesul genezei embrionare a organelor limfoide primare, deoarece asigura migrarea în timus, respectiv în bursa lui Fabricius si echivalentii ei, a precursorilor limfocitelor T si B (pre-T si pre-B). Procesul recircularii permite ca limfocitele mature neangajate sa dobândeasca acces la structurile care concentreaza antigenele ce au patruns pe cale tegumentara sau pe calea mucoaselor si sa întâlneasca epitopul specific. Limfocitele T activate, prolifereaza si se diferentiaza. Atât cele activate, cât si cele de memorie manifesta *selectivitate de organ*, adica recircula în acelasi tip de organ limfoid secundar. Migrarea cu specificitate de organ, a celulelor T de memorie, mareste eficienta raspunsului imun, deoarece reîntâlnesc antigene asemanatoare celor care le-au indus activarea primara. Mecanismul migrarii selective este putin înteles. Probabil implica mecanisme de trafic selectiv, controlat de molecule membranare. La organismul adult, limfocitele recoltate din ductul toracic migreaza preferential în MALT, iar cele din ganglionii limfatici se reîntorc în ganglioni, în ariile timo-dependente. Limfocitele T si B recoltate din splina, dupa transferul în organismul receptor, se distribuie în compartimentele T si B ale organelor limfoide secundare. Majoritatea limfocitelor din maduva osoasa, migreaza în ariile timo-independente.

Ariile *timo-independente* (populate de limfocite B) ale organelor limfoide secundare sunt: *foliculii cortexului extern din ganglionii limfatici, foliculii din placile Peyer si foliculii zonei periferice din pulpa alba a splinei.*

Ariile *timo-dependente* (populate de limfocite T) sunt: *cortexul profund al ganglionilor* (paracortex), *mansonul limfoid periarteriolar al pulpei albe a splinei si zonele interfoliculare ale placilor Peyer.*

Bazele moleculare ale fenomenului de homing

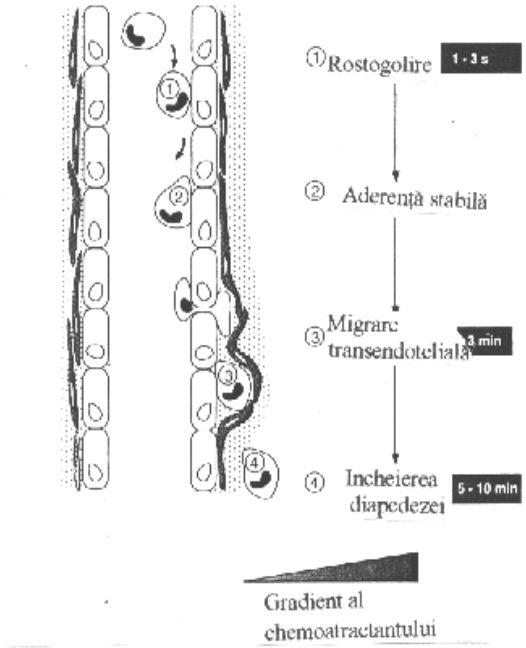


Fig. 50. Secventa de evenimente ce regleaza *migrarea limfocitelor din sânge* prin peretii venulelor cu endoteliu înalt (HEV), în organele limfoide. Miscarea de rostogolire a limfocitelor pe suprafata celulelor endoteliale este convertita repede în aderenta stabila dependenta de integrine, în 1-3 s. Migrarea transendoteliala a limfocitului aderent este reglata de un "stimul de migrare" exprimat de celulele endoteliale înalte. Bazele moleculare ale stadiului final al migrarii prin membrana bazala nu se cunosc, dar probabil este reglata de chimioatractantii eliberati de ganglionul limfatic (dupa Ager, 1998).

Fiziologia recircularii limfocitelor se bazeaza, în esenta, pe reglarea proprietatii lor de aderenta si mobilizare. Limfocitele au proprietatea rara, de a-si regla proprietatile adezive, toata durata vietii. Daca în sânge limfocitele nu trebuie sa adere între ele sau de alte celule circulante si nici de endotelii, trecerea lor în spatiul extravascular necesita aderenta ferma de celulele endoteliale.

Traficul limfocitar im-plica evenimente complexe, care duc la recrutarea celulelor din fluxul sanguin. Procesul implica încetinirea deplasarii limfoci-telor, la contactul cu endoteliul vascular, apoi aderenta strânsa de celulele endoteliale, urmata de migrarea transendoteliala.

Fenomenul migrarii pre-ferentiale a limfocitelor din sânge, în tesuturile limfoide specifice (homing), este explicat prin existenta

moleculelor cu rol de aderenta, denumite generic *adezine*, atât pe suprafata limfocitelor cât si pe suprafata venulelor cu endoteliu înalt (HEV).

Adezinele suprafetei limfocitelor sunt *receptori specifici de homing*, iar cele de pe suprafata celulelor endoteliale ale venulelor au rol de *antireceptori*. Atât unele cât si altele apartin familiei *integrinelor*. Ambele categorii de molecule mediaza interactiunea selectiva a celulelor sanguine cu endoteliul vascular, ca o preconditie a migrarii în tesuturi si se numesc *selectine*.

Selectina L se gaseste pe suprafata celor mai multe leucocite circulante: limfocite, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte doua tipuri (E,P), selectina L este exprimata *constitutiv* pe suprafata celulelor. Rolul ei este medierea tranzitului leucocitelor în situsul inflamator, dar si în orientarea specifica a recircularii constitutive spre ganglionii limfatici periferici.

Deoarece fenomenul recircularii limfocitelor este permanent, selectinele corespunzatoare sunt exprimate de asemenea permanent, atât pe celulele endoteliale ale venulelor cât si pe limfocite.

Interactiunea limfocitelor cu selectinele endoteliale s-a studiat *in vitro*, prin incubarea limfocitelor cu sectiuni subtiri de tesut limfoid. Limfocitele se leaga specific de venulele cu endoteliu înalt (HEV) si în proportie nesemnificativa, de endoteliul altor vase sanguine.

Limfocitele B adera preponderent de HEV din placile Peyer, iar limfocitele T adera preferential de HEV din ganglionii limfatici.

Dupa legarea specifica a receptorilor limfocitari de antireceptorii celulelor endoteliale, se initiaza evenimentele al caror rezultat este extravazarea limfocitelor din tesuturile limfoide secundare.

Trecerea limfocitelor din fluxul sanguin, prin peretele vascular, are loc în mai multe etape:

- deschiderea jonctiunilor strânse dintre celulele endoteliale (în 5-10 minute);
- migrarea selectiva a limfocitelor T si B, în ariile caracteristice, în orele urmatoare.

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor (GALT si MALT) are particularitati distincte fata de recircularea limfocitelor în celelalte organe limfoide secundare. Principala diferenta consta în aceea ca, într-o masura importanta, sistemul imunitar al mucoaselor este separat din punct de vedere functional, de aparatul imunitar sistemic. Separarea este rezultatul modului preferential de

recirculare a limfocitelor în GALT si BALT si anume, limfoblastele generate în structurile limfoide ale tractului gastrointestinal circula în ductul toracic si au tendinta de a se reîntoarce în aceleasi structuri limfoide.

Limfocitele recircula în sânge si reintra în tesutul limfoid secundar. Celulele mature, neangajate, se distribuie aleatoriu în structurile MALT si asigura existenta întregului repertoriu de receptori de antigen.

Limfa ductului toracic este calea finala comuna a întregii cantitati de limfa generata sub nivelul diafragmei, majoritatea având originea în teritoriul intestinal. In ductul toracic se gasesc limfocite mari (blaste). Celulele efectoare si de memorie manifesta un homing preferential, care mentine compartimentarea limfocitelor. Limfocitele stimulate si blastele generate în structurile MALT, dupa ce sunt descarcate în sânge, extravazeaza rapid în lamina propria si revin cu o mare probabilitate în aceleasi structuri sau se distribuie în structuri limfoide omologe, asociate altor mucoase. Multe se transforma în plasmocite care sintetizeaza IgA. Pentru ca celulele stimulate la nivelul tractului gastrointestinal recircula spre alte situsuri mucoase(plamân, glande mamare, tractul urogenital) s-a propus conceptul de “sistem imunitar comun al mucoaselor”. Chiar daca proportia limfocitelor care recircula preferential la nivelul diferitelor mucoase (tractul respirator si urogenital) este limitata, fenomenul este foarte important, deoarece sugereaza posibilitatea stimularii imunitatii protectoare generale, la toate situsurile mucoase, folosind un vaccin oral.

În placile Peyer si în foliculii limfatici solitari ai mucoasei gastrointestinale se gasesc preponderent limfocite B cu izotip IgA, dar si limfocite B cu izotip IgG si IgM. Preponderenta lor numerica se explica prin aceea ca se leaga mai ferm de venulele cu endoteliu înalt, comparativ cu limfocitele T. Dupa contactul cu antigenul, ele se activeaza, prolifereaza si se diferentiaza. Totusi, în placile Peyer, practic nu exista celule producatoare de anticorpi. Acest fapt denota ca placile Peyer sunt structuri limfoide specializate în medierea contactului dintre limfocite si antigenele tractului digestiv, dar celulele B dupa stimulare migreaza din placile Peyer înainte de a se diferentia în plasmocite. Blastele rezultate din celulele B stimulate, parasesc placile Peyer pe cale limfatica si ajung în ganglionii limfatici mezenterici. De aici, blastele migreaza selectiv în mucoasa digestiva si respiratorie si constituie tesutul limfoid difuz.

Limfocitele T au o modalitate mai putin restrictiva de a migra în mucoase. In structurile limfoide ale mucoasei, celulele T sunt minoritare. Rolul lor pare a fi limitat la efecte reglatoare asupra limfocitelor B.

În concluzie, recircularea limfocitelor B la nivelul mucoaselor este

restrictiva, în sensul ca celulele stimulate de antigene, în structurile limfoide ale mucoasei digestive au o tendinta marcata de a recircula în structuri limfoide asociate mucoaselor. S-a avansat ipoteza unei specificitati de organ a recircularii limfocitelor B. Cele activate în BALT vor recircula în mucoasa respiratorie, iar cele activate în GALT vor recircula la nivelul mucoasei digestive, asigurând o eficienta protectoare maxima.

Recircularea limfocitelor în compartimentul tertiar nelimfoid

Dintre tesuturile nelimfoide, cele mai cunoscute în privinta raporturilor lor cu limfocitele sunt suprafetele *epiteliale*: epiteliul tegumentar si mucoasele tractului gastrointestinal, urogenital si respirator. Aceste structuri se caracterizeaza prin prezenta a doua componente limfoide distincte. Prima, evidentiata la soarece, populeaza epiteliile în cursul dezvoltarii embrionare. Acestea sunt limfocite cu localizare *intraepiteliala* (IEL) si pentru a se diferentia sau pentru a se mentine în aceasta localizare, nu necesita contactul cu antigenul exogen. Se pare ca limfocitele intraepiteliale îsi au originea direct în *organele limfoide primare* sau chiar în maduva osoasa, fara sa necesite un stadiu de tranzit prin organele limfoide secundare.

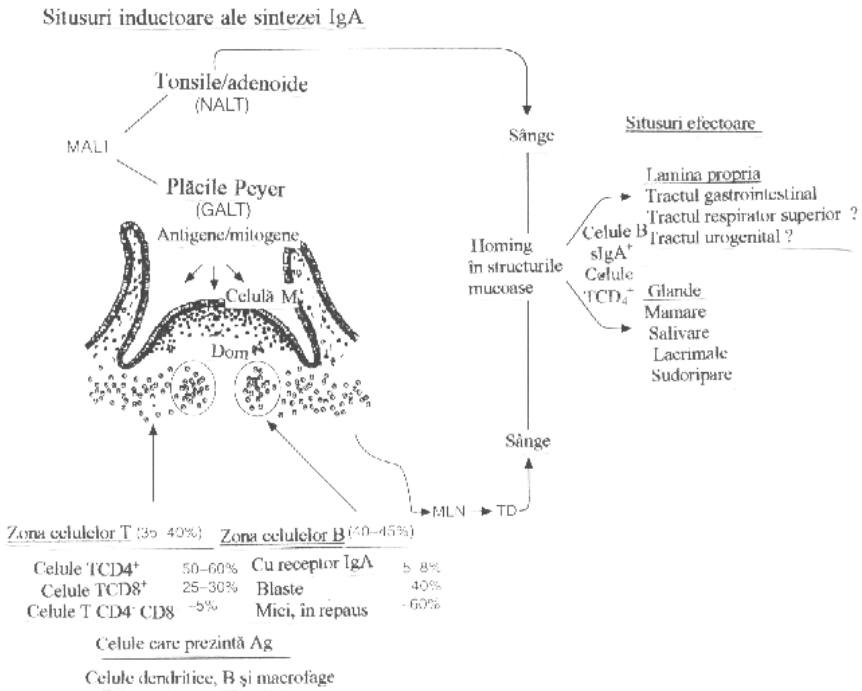


Fig. 51. Rolul MALT în *inducerea sintezei IgA* în mucoase. Inglobarea antigenului de catre celulele M, declanseaza raspunsul imun local. Limfocitele B IgA^+ si Th CD_4^+, pe calea limfaticelor eferente, migreaza în ganglionii limfatici mezenterici si apoi în ductul toracic, pentru a ajunge în sânge. Aceste celule migreaza în situsurile în care IgA este molecula efectoare, unde are loc diferentierea finala, sinteza si transportul sIgA. Stimularea limfocitelor în MALT si exodul celulelor spre situsurile efectoare justifica denumirea de "sistem imunitar comun al mucoaselor".

A II-a categorie de limfocite din structurile nelimfoide sunt, în special, *limfocite T de memorie si limfocite efectoare* care s-au activat în *organele limfoide secundare*. Ele au localizare intraepiteliala sau se gasesc în tesutul conjunctiv subepitelial.

Celulele epiteliale regleaza direct activitatea celulelor limfoide, atât prin proximitatea lor directa, cât si prin capacitatea de a sintetiza citochine, ce activeaza si/sau recruteaza celulele efectoare.

Limfocitele intraepiteliale sunt, în primul rând celule T, cu receptor α-β sau γ-δ. Suprafata foarte mare a epiteliilor, trebuie sa fie corelata cu existenta mai multor IEL, decât alte tipuri de celule T. Majoritatea sunt bogate în *granule citotoxice*, ceea ce a dus la presupunerea ca IEL recunosc si lizeaza celulele epiteliale infectate, formând *prima linie de*

aparare. Este greu de explicat modul în care celulele T, cu o diversitate foarte larga a specificitatii de legare a receptorilor de antigen, recunosc epitopii specifici expusi pe suprafata celulelor epiteliale fixe. De aceea, s-a presupus ca IEL recunosc *semnalele de stress imunitar*, si nu epitopii specifici ai agentilor infectiosi. Semnalele sunt transmise de proteinele înrudite (MICA, MICB), dar distincte de moleculele CMH I. Aceste molecule nu prezinta antigenul, dupa modelul clasic al moleculelor CMH, ci IEL recunosc diferentele nivelului de exprimare a moleculelor MICA si MICB, pe suprafata celulelor normale si a celor stressate. Stimulii activarii MICA si MICB pot fi de natura infectioasa sau evenimente de transformare care pun în pericol integritatea organismului.

IEL sunt pozitive numai pentru $CD_8\ \alpha$ ($CD_8\ \alpha^+,\beta^-$) sau sunt negative pentru ambii coreceptori ($CD_4^-\ CD_8\ \alpha^-,\ \beta^-$). Se pare ca epiteliile favorizeaza dezvoltarea extratimica a IEL, care vin direct din maduva osoasa.

Limfocitele asociate epiteliilor recircula cu o rata scazuta, care poate fi constitutiva, dar se amplifica mult dupa stimularea antigenica locala.

În tesuturile nelimfoide, limfocitele T realizeaza controlul de calitate a moleculelor expuse pe suprafata celulelor tisulare. Daca este detectata prezenta antigenelor nonself (virale, tumorale sau induse chimic), limfocitele T initiaza raspunsul imun citotoxic.

Capitolul 4

ANTIGENELE COMPLEXULUI MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (C M H)

Existenta antigenelor de histocompatibilitate a fost dedusa din faptul ca alografele tegumentare sau de organe, nu sunt viabile în organismul receptor. Dupa 7-10 zile, tesutul transplantat se inflameaza si curând dupa aceea, grefa este respinsa.

Respingerea grefei este de natura imunitara: sistemul imunitar al receptorului de grefa recunoaste ca nonself, anumite molecule ale celulelor grefei si se activeaza. Moleculele de suprafata ale celulelor grefate, recunoscute ca nonself, sunt denumite *antigene de histocompatibilitate*. Ele confera individualitate biochimica fiecarui individ.

Antigenele de histocompatibilitate se definesc ca molecule ale suprafetei celulare si care, datorita diferentelor biochimice individuale sunt recunoscute de sistemul imunitar al unui organism cu un alotip diferit (cu o alta combinatie de gene alele la situsul codificator).

Diversitatea biochimica la nivel individual a acestor molecule, sta la baza unicitatii biochimice a fiecarui individ uman si este determinata de o diversitate genetica corespunzatoare.

Deoarece se comporta ca antigene majore în organismul receptor de grefa, antigenele CMH se numesc si *antigene de transplantare*.

În functie de capacitatea lor de a stimula raspunsul imun de respingere a grefei, antigenele CMH sunt *tari* si *slabe*.

Antigenele CMH tari reprezinta principala bariera în calea transplantului de tesuturi si organe. La soarece, moleculele CMH tari apartin sistemului H-2. Grefele de tesuturi si organe între organisme care difera prin antigenele complexului H-2 ale suprafetei celulare sunt invariabil respinse în 10-14 zile. Antigenele tari apartin claselor I si II.

Antigenele slabe (usoare) sunt codificate de *sistemul minor de histo-compatibilitate* si determina respingerea lenta a grefei de piele, în circa 200 de zile.

La om, corespondentul sistemului molecular antigenic H-2 de la soarece este complexul antigenic al *sistemului HLA* (*H*uman *L*eucocyte *A*ntigen). Denumirea semnifica faptul ca moleculele sistemului au fost detectate initial (J. Dausset, 1958), pe suprafata leucocitelor.

Antigenele complexelor H-2 si HLA au o varietate antigenica

individuala si de aceea natura lor chimica se poate studia numai în populatii genetic pure (inbred) de soarece, obtinute prin împerecheri multiple între indivizii aceleiasi descendente.

Structura moleculara a antigenelor CMH clasa I

Antigenele codificate de genele CMH clasa I sunt glicoproteine de membrana, a caror regiune C-terminala se gaseste în citoplasma, iar c e a N-terminala este expusa extracelular.

O molecula CMH clasa I este alcatuita dintr-un lant *H* (*H*eavy) polipeptidic glicozilat (45 kD), în asociatie strânsa, necovalenta, cu β-*2 microglobulina* (12 kD), un polipeptid care se gaseste si în ser.

Catena H este alcatuita din 339 aminoacizi, distribuiti în urmatoarele 5 domenii:

– *trei domenii extracelulare*, în regiunea N-terminala, notate cu α-l, α-2, α-3, fiecare cu câte 90 de aminoacizi. Sub actiunea papainei, pot fi clivate de restul moleculei. Domeniile α-2 si α-3 prezinta legaturi S-S intracatenare si formeaza bucle de 63 si respectiv 86 aminoacizi;

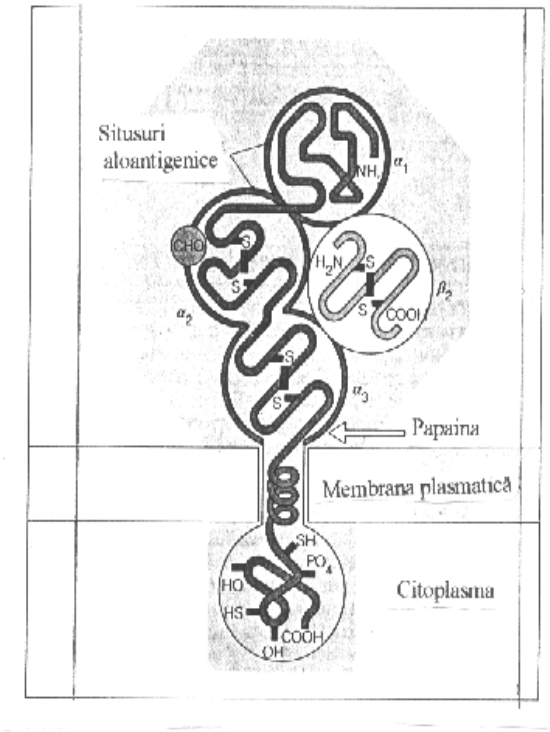


Fig. 52. Reprezentare schematica a structurii *moleculelor CMH clasa I*, ancorate în

membrana citoplasmatica. Catena codificata de gena CMH prezinta 3 domenii globulare (α-1, α-2, α-3). Domeniul α-3 este asociat cu un peptid – β-2 microglobulina, un mic peptid globular de 12 kD cu o structura tertiara asemanatoare unui domeniu al Ig, stabilizat printr-o punte S-S.

– *domeniul transmembranar* contine 25 resturi de aminoacizi hidrofobi, care traverseaza membrana. Imediat deasupra acestui domeniu se gasesc 5 aminoacizi bazici (Arg, Leu), tipici pentru proteinele legate de membrana, cu rolul de a ancora lantul polipeptidic în membrana;

– *domeniul hidrofil cito-plasmatic* (30 de aminoacizi la om, 40 la soarece), contine în special serina, unele resturi fiind fosforilate, este implicat în transmiterea semnalului de la domeniile extracelulare, la mediatorii citoplasmatici. Acest domeniu contine resturi de cisteina cu rol în legarea prin intermediul puntilor S-S, de alte catene H sau de proteine citoplasmatice.

Componenta *glucidica* este alcatuita din doua grupari, fiecare fiind formata din 12-15 resturi de zaharuri, atasate de domeniile α-1 si α-2. Sunt oligozaharide care contin manoza, de care se leaga catene laterale de glucozamina si acid sialic.

Catena H are o regiune variabila în jumatatea N-terminala, cu doua subzone hipervariabile, care difera prin mai mult de 60% din aminoacizi, de la un organism la altul, localizate în domeniile α-1 si α-2. Studiile prin difractie cu raze X ale domeniilor extracelulare, cristalizate dupa clivarea cu papaina arata ca domeniile α-1 si α-2 sunt foarte asemanatoare ca secventa de amino-acizi si prin pliere formeaza împreuna *o cavitate moleculara*, presupusa a fi situsul de legare stabila a epitopului antigenic. Cavitatea, sustinuta de secvente β-pliate ale acelorasi domenii α-1 si α-2, este ocupata de o molecula lineara, care este un *peptid* ce cristalizeaza concomitent cu catena H. Situsul cavitar, dupa ce leaga antigenul, formeaza un complex recunoscut de limfocitele TCD_8. Restul catenei H corespunde regiunii constante.

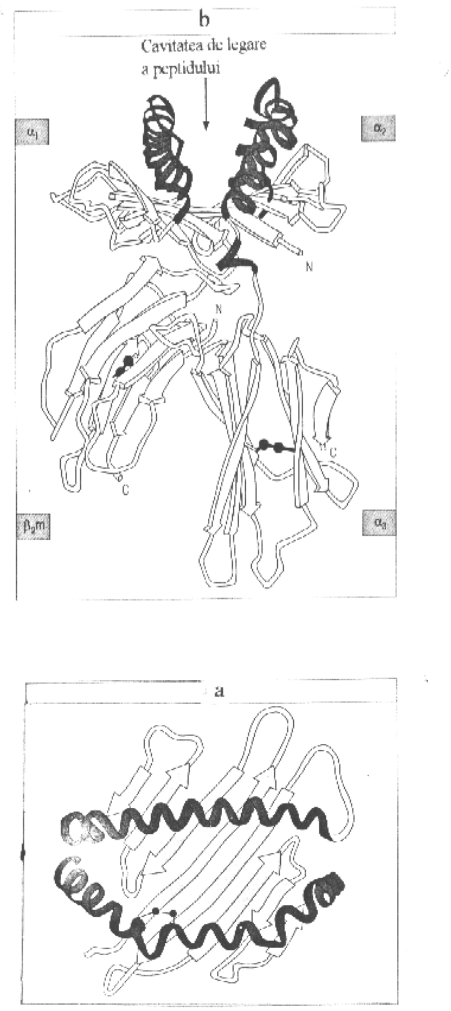


Fig. 53. **a**. Reprezentarea schematica în "ochi de pasare" a suprafetei superioare a *moleculei CMH clasa I umane*, bazata pe structura obtinuta în cristalografie cu raze x. Secventele β-pliate care formeaza baza cavitatii sunt marcate prin sageti groase, orientate în directia amino-carboxil. Secventele α-helicale sunt reprezentate prin liniile groase spiralate. Suprafetele interne ale celor doua helice si fata superioara a secventelor β-pliate formeaza o cavitate. Cele doua sfere negre reprezinta o legatura S-S intracatenara. **b**. Vedere laterala a aceleiasi molecule, care arata anatomia cavitatii si plierea domeniilor α-3 si β-2 m (4 catene β-pliate antiparalele pe o fata si 3 pe cealalta) (dupa Roitt, 1997)

β-*2 microglobulina* (β-2 m) (o globulina mica, ce migreaza la

electroforeza în regiunea β-2) a fost descoperita în 1968, în urina pacientilor cu disfunctie renala provocata de intoxicatia cronica cu cadmiu. Este sintetizata de majoritatea celulelor din organism. Contine circa 100 aminoacizi, cu usoare variatii numerice. Nu prezinta variabilitate detectabila pe cale chimica sau imunologica si nu este glicozilata.

Ca si domeniul α-3 al catenei H, β-2 m prezinta omologie a secventei de aminoacizi cu domeniile constante ale moleculei de Ig. Secventa de aminoacizi a β-2 m formeaza un singur domeniu stabilizat printr-o punte S-S, între doua resturi de cisteina.

β-2 m se asociaza necovalent cu lantul H al moleculei CMH clasa I, prin interactiunea cu domeniul α-3, dar studiile recente de cristalografie cu raze X, sugereaza un contact extins cu toate cele trei domenii. Moleculele de β-2 m legate, se afla în echilibru cantitativ cu cele din plasma.

Asocierea celor doua catene se face dupa terminarea sintezei lor si este o conditie obligatorie pentru transportul moleculelor CMH I de la reticulul endoplasmic la membrana citoplasmatica si pentru ancorarea lor în membrana. Celulele liniei Daudi (derivata din limfomul Burkitt), desi sintetizeaza catena H, nu exprima molecule CMH I, deoarece nu sintetizeaza β-2 m.

Moleculele CMH I au un turnover constant. Cele vechi se elibereaza si trec în circulatie sau sunt endocitate si se sintetizeaza altele noi. Stabilitatea lor este conditionata de rata disocierii peptidului si β-2 m. Catenele H libere se denatureaza si sunt degradate.

Moleculele CMH clasa I sunt adevarate “certificate de identitate” biochimica si genetica, pentru fiecare organism, datorita polimorfismului lor biochimic foarte accentuat. Ele vegheaza la pastrarea homeostaziei biochimice a organismului si devin tinta sistemului imunitar în urmatoarele situatii:

– dupa grefarea tesuturilor si organelor care poarta molecule incompatibile;

– dupa ce se asociaza cu antigenele virale, tumorale sau cu cele induse de agentii chimici;

– dupa modificarea biochimica printr-un proces mutational.

Structura moleculara a antigenelor CMH clasa II

Antigenele CMH clasa II-a sunt glicoproteine heterodimere de membrana, formate din doua catene diferite, notate cu α si β.

Prin solubilizare cu detergent, aceste molecule se elibereaza întregi. Lantul α are 30-34 kD, iar lantul β are 26-29 kD.

Fiecare catena este formata din 4 domenii:

– doua extracelulare, alcatuite din circa 90 de aminoacizi fiecare, notate cu α-1, α-2, respectiv β-1, β-2;

– un domeniu transmembranar (circa 30 de aminoacizi);

– un domeniu citoplasmatic (10-15 aminoacizi).

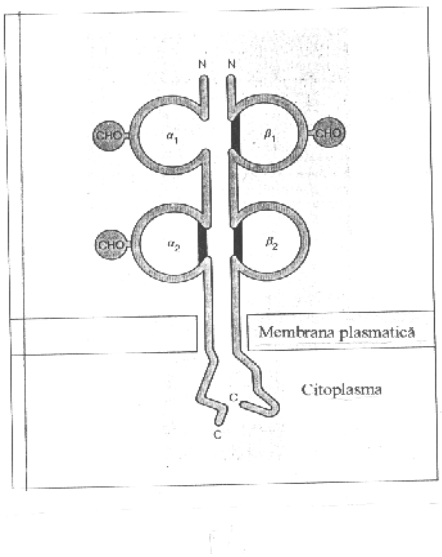


Fig. 54. Reprezentarea schematica a *moleculelor CMH clasa II-a*. Molecula este formata din 2 catene diferite (α si β), legate necovalent, a caror extremitate C-terminala se insera în citoplasma. Cele doua catene au câte doua domenii globulare, asemanatoare cu domeniile Ig. Cu exceptia domeniului α-1, toate celelalte sunt stabilizate printr-o punte S-S intracatenara. Cele doua catene sunt glicozilate (dupa Roitt, 1997).

Domeniile α-1 si β-1 au o variabilitate accentuata a secventei de aminoacizi. Ele se asociaza pentru a forma o structura ce delimiteaza o *cavitate în care este legat peptidul antigenic*.

Domeniile α-2 si β-2 pre-zinta omologie a secventei de aminoacizi, cu domeniile mole-culei de Ig.

Domeniile α-2, β-1 si β-2 sunt stabilizate prin legaturi S-S, iar domeniile α-1, α-2 si β-2 sunt gli-cozilate. Gruparea glucidica contine

manoza, galactoza, fucoza, glu-cozamina. Diferentele greutatii mo-leculare a celor doua catene se dato-reaza nivelului diferit de glicozilare.

Determinismul genetic al moleculelor CMH

Moleculele CMH sunt codificate de genele complexului major de histocompatibilitate. Calificativul “complex” este justificat de numarul mare de gene componente, iar cel de “major” semnifica importanta deosebita a moleculelor codificate de aceste gene, în realizarea unor functii imunitare importante:

– elaborarea raspunsului imun

– respingerea grefelor de tesuturi si organe.

În raport cu tipul de proteine pe care le codifica, genele CMH apartin clasei I si clasei a II-a.

La soarece, genele CMH codificatoare ale moleculelor complexului antigenic H-2 sunt localizate pe cromosomul 17, într-un fragment de 2000-4000 kb perechi, suficient de mare pentru a codifica circa 200 de proteine de dimensiuni medii. In acest complex se gasesc 3 tipuri de gene descoperite independent:

– *primul grup de gene* (descoperit în anii ’40) codifica antigenele “tari” de transplantare, care induc respingerea rapida a grefelor de tegument si de organe, între indivizi neidentici genetic (apartin unor alotipuri diferite). Acestea sunt genele CMH clasa I, care codifica moleculele CMH clasa I;

– al II-lea grup, denumite *genele raspunsului imun* (IR) codifica sinteza unor molecule care conditioneaza *intensitatea raspunsului imun* al organismului, slab sau puternic, fata de un antigen. Genele IR codifica proteinele clasei a II-a de molecule CMH, denumite si molecule *Ia* (I associated);

– al III-lea set de gene ale complexului CMH codifica sinteza unor componente ale *complementului.*

La soarece, moleculele CMH I sunt codificate de gene situate la extremitatile complexului genic H-2, notate K si D. Gena K are circa 55 de variante alelice. Fiecare varianta codifica proteine distincte.

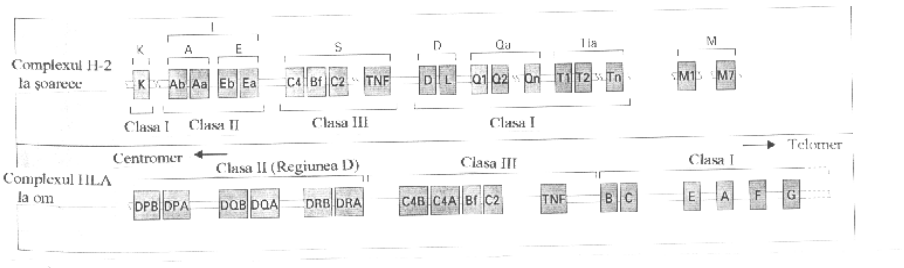


Fig. 55. Reprezentare diagramatica a localizarii *subregiunilor genice CMH* la soarece si om si pozitia genelor majore în aceste subregiuni. La om, locusurile genice clasa II-a sunt localizate între centromer si locusurile clasei I, ca si la alte specii de mamifere.

Complexul H-2 la soarece (pe cromosomul 17).

Regiunea cromosomala	K	I	S	D
Clasa	I	II	III	I
Locusuri genice	K	A , E	C4, C2, Bf, TNF	D , L

La om, moleculele CMH clasa I sunt codificate de *genele HLA*, iar moleculele CMH II, de *regiunea cromosomala D*, localizate pe cromosomul 6.

Moleculele CMH I sunt codificate de trei gene: HLA-A, HLA-B, HLA-C. S-au descris genele HLA-E, -F, -G, -H si -J, dar acestea sunt considerate gene neclasice pentru ca produsele lor de sinteza se deosebesc structural si functional de ale genelor HLA-A, -B si –C.

Moleculele CMH II sunt codificate de regiunea cromosomala HLA-D, ce apartine genelor clasei a II-a.

Genele clasei a III-a codifica sinteza acelorasi proteine plasmatice (C4, C2, Bf).

Complexul HLA (pe cromosomul 6).

R e g i u n e a cromosomala	D	C4, C2, Bf	B C A	E, F, G, H, J
Clasa	II	III	I	Gene neclasice
Locusuri genice	DP, DQ, DR	C4, C2, Bf	B C A	E, F, G, H, J

Genele HLA clasa I si II au cel mai înalt grad de polimorfism genetic dintre toti determinantii genici cunoscuti ai organismului uman:

HLA-A are 83 de alele
HLA-B, 185 de alele
HLA-C, 42 de alele.

Numarul alelelor este în continua crestere pe masura ce se identifica noi variante. Polimorfismul genic este consecinta existentei a cel putin doua alele pentru un locus. Pe fiecare din cei doi cromosomi pereche, un individ prezinta 3 gene CMH diferite (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Celulele umane prezinta 6 variante diferite de gene clasa I, câte trei de la fiecare parinte. Genele CMH I sunt *codominante*, astfel ca pe suprafata fiecarei celule se exprima produsele de sinteza ale ambelor alele parentale. Se sintetizeaza astfel 6 variante biochimice de molecule CMH I.

Într-o populatie umana, moleculele CMH I si CMH II sunt foarte diferite din punct de vedere biochimic, ca o expresie a polimorfismului genic al indivizilor umani.

Antigenele HLA-A, B si C sunt antigenele majore recunoscute de sistemul imunitar al gazdei, în reactia de respingere a grefei. Cantitativ, moleculele HLA-C sunt inferioare fata de HLA-A si HLA-B. Toate sunt capabile sa prezinte antigenul. Moleculele CMH neclasice (E, F, G) nu prezinta antigenul.

Polimorfismul biochimic al moleculelor CMH I este limitat la domeniile α 1 si α 2, la nivelul secventelor ce formeaza cavitatea moleculara

Genele CMH II sunt localizate în regiunea HLA-D. Regiunea genica HLA-D controleaza raspunsul limfocitelor în amestec. Specificitatile alelice ale genelor CMH II au fost definite prin tipizare *limfocitara* si apartin locusurilor Dw si HLA-DP sau prin tipizare *serologica* si apartin locusurilor HLA-DP, DQ, DR.

Regiunea D este divizata în trei subregiuni functionale majore, care codifica moleculele DR, DQ si DP. In subregiunile DQ si DP se gaseste o pereche de gene functionale DQA_1 si DQB_1, respectiv DPA_1 si DPB_1, care codifica cele doua catene (α si β) ale moleculei CMH II.

Subregiunea DR este mai complexa. Ea contine o singura gena pentru sinteza catenei α, DRA_1 si una sau doua gene pentru sinteza catenei β (DRB_1, DRB_3, DRB_4 sau DRB_5).

Numarul alelelor:

DRA_1	2
DRB_1	184
DRB_3	11

DRB_4	8
DRB_5	12
DQA_1	18
DQB_1	31
DPA_1	10
DPB_1	77

Ca si genele codificatoare ale moleculelor CMH I, genele codificatoare ale moleculelor CMH II sunt *codominante*. Se sintetizeaza astfel 8 variante biochimice de molecule CMH II (deoarece sunt doua gene codificatoare ale genei β pentru mlecula HLA-DR).

Combinarea aleatorie a numarului mare de alele explica polimorfismul extensiv al moleculelor CMH într-o populatie umana. Numarul combinatiilor genice posibile între aceste alele este evaluat la circa 10^{90}, un numar cu mult mai mare decât al indivizilor umani care coexista la un moment dat. In contextul existentei unui numar mare de gene alele codificatoare, posibilitatea ca doi indivizi neînruditi sa aiba proteine identice ale moleculelor CMH clasele I si II este mica. Nu exista doi indivizi identici pentru toate cele 6 variante de molecule CMH I si pentru cele 8 variante de molecule CMH II.

Moleculele CMH I si II au rolul de a lega peptidele antigenice. O varianta moleculara poate sa lege un numar limitat de peptide antigenice(de ordinul milioanelor), dar probabilitatea unei potriviri spatiale creste mult prin existenta a 6 variante de molecule CMH I si a 8 variante de molecule CMH II.

Peptidul antigenic este legat deosebit de stabil în situsul cavitar al moleculelor CMH I si II.

Evaluarea diferentelor antigenice ale moleculelor CMH

Fiecare organism are o specificitate antigenica proprie conferita de moleculele CMH clasa I. Diferentele antigenice dintre indivizii alotipici ai unei specii, dependente de moleculele CMH I se evalueaza *serologic*. Serul imun specific anti-molecule CMH se obtine prin injectarea unei suspensii de leucocite, la un organism al aceleiasi specii, diferit din punct de vedere genetic, adica un organism cu o alta combinatie de gene alele codificatoare ale moleculelor CMH I. Organismul receptor sintetizeaza anticorpi fata de antigenele HLA ale leucocitelor donorului, care se deosebesc de propriile sale molecule.

Specificitatea antigenica a unui organism poate sa conste în prezenta unei molecule antigenice pe sau în celulele sale, care nu exista

pe sau în celulele altor organisme sau se datoreaza unor diferente structurale fine ale moleculelor de histocompatibilitate, prezente la toate organismele speciei, în variante genetice distincte.

Anticorpii anti-HLA se gasesc în serul femeilor multipare si se sintetizeaza ca rezultat al stimularilor antigenice HLA de origine paterna, exprimate pe celulele fatului, dar absente pe suprafata celulelor organismului matern. Leucocitele fatului care strabat bariera placentara trec în circulatia materna si induc sinteza IgG, cu persistenta îndelungata în circulatie.

O alta sursa de ser imun anti-HLA o constituie *pacientii politransfuzati*. Astfel ei se imunizeaza fata de antigenele HLA alotipice de pe suprafata leucocitelor donorilor de sânge.

Antiserurile HLA se pot obtine prin imunizarea voluntarilor.

Diferentele antigenice dintre doi indivizi, determinate de moleculele CMH clasa II-a se evalueaza prin capacitatea lor de a initia *reactia limfocitara mixta* (RLM). Limfocitele de la doi indivizi ce poarta alele diferite la locusul HLA-D sunt co-cultivate *in vitro*. Conditia reactivitatii limfocitare este diferenta unei singure alele la locusul ce codifica aceste molecule.

Indivizii care au molecule CMH I identice nu reactioneaza serologic, dar daca celulele lor difera prin moleculele CMH II, codificate de alele diferite ale locusului HLA-D produc un raspuns intens în RLM.

Într-un amestec de celule limfoide homozigote *aa* si *bb* se activeaza ambele populatii de limfocite, deoarece limfocitele *aa* reactioneaza fata de antigenul *b*, iar limfocitele *bb* se activeaza fata de antigenul *a*. Intr-un amestec de limfocite homozigote *aa*, cu populatia de limfocite heterozigote *ab*, raspund numai limfocitele *aa*. Raspunsul bidirectional apare si în amestecul limfocitelor *ac* si *ab*.

De obicei se evalueaza capacitatea limfocitelor receptorului de grefa de a se activa fata de antigenele donorului si pentru a induce un raspuns unidirectional, populatia de limfocite a donorului este tratata cu mitomicina C (un inhibitor al sintezei ADN) sau este iradiata. Tratamentul nu modifica imunogenitatea celulelor. Functia stimulatoare a celulelor limfoide este restrânsa la celulele specializate prezentatoare de antigen, radiorezistente si care nu se divid *in vitro.* Raspunsul celulelor în RLM este orientat exclusiv fata de moleculele CMH I si II. Moleculele CMH II constituie un stimul primar esential pentru RLM.

Moleculele CMH clasa I si II au rol esential în elaborarea raspunsului imun, iar din punct de vedere antigenic, determina respingerea alografelor (grefe între indivizi ai aceleiasi specii, dar apartinând unor alotipuri diferite).

Distributia tisulara a moleculelor CMH I si II si semnificatia lor evolutiva

Moleculele CMH I se gasesc pe suprafata majoritatii tesuturilor, pe celulele endoteliale ale capilarelor, iar leucocitele exprima cea mai înalta densitate a moleculelor CMH I: 1% din moleculele de suprafata ale membranei leucocitare sunt molecule HLA.

Moleculele CMH I au o densitate mai mica pe suprafata celulelor hepatice, din plamân, rinichi si sunt foarte diluate pe suprafata celulelor musculare si a celor mai multe glande endocrine (cu exceptia suprarenalelor).

Moleculele CMH II sunt exprimate predominant, pe suprafata limfocitelor B si pe celulele specializate pentru prelucrarea si prezentarea antigenelor: celulele seriei monocit-macrofag, celulele endoteliale ale capilarelor sanguine si limfatice, celulele Kupffer, celulele dendritice, eozinofile, microglia SNC.

Moleculele CMH lipsesc pe eritrocite, pe celulele endoteliului corneean, pe componenta exocrina a pancreasului, pe celulele acinare ale glandelor parotide, pe neuronii SNC, pe celulele endoteliale ale capilarelor SNC, pe tesutul placentar.

În conditii normale, o forma solubila de molecule HLA se gaseste în plasma. Nivelul ei creste marcat în timpul infectiei virale, probabil datorita cresterii ratei sintezei moleculelor HLA, stimulata de interferon si de alte citochine.

Intensitatea exprimarii noleculelor CMH II este variabila, fiind controlata de diferiti factori: interferonul γ si IL-2, sintetizati de limfocitele T, amplifica nivelul de exprimare a moleculelor CMH II, iar PGE_2, glucocorticoizii, α-fetoproteina, LPS din bacteriile Gram negative, diminua densitatea acestor molecule, având astfel rol imunosupresor.

Limfocitele B si celulele tumorale secreta molecule CMH II.

Privita în perspectiva evolutiei, existenta moleculelor CMH nu semnifica respingerea grefelor de tesuturi si organe, deoarece acestea nu se realizeaza în mod natural, ci au fost introduse în practica medicala a ultimelor decenii. In sens evolutiv, existenta moleculelor CMH ar putea fi atribuita necesitatii organismelor de a semnaliza rapid, celulele care prezinta molecule antigenice pe suprafata lor: celulele infectate cu virusuri sau cele transformate malign. In acest context, moleculele CMH au o semnificatie deosebita: pentru supravietuirea organismului, liza celulelor purtatoare de molecule nonself trebuie sa fie rapida, înainte ca virusul sa se multiplice si respectiv, înainte ca celula maligna sa se divida si sa formeze o microtumora.

Pentru ca interventia limfocitelor Tc sa fie eficienta, este necesar ca moleculele CMH sa fie prezente pe oricare celula ce poate fi infectata de un virus sau poate sa fie transformata malign. Pe de alta parte, moleculele CMH, al caror rol esential este acela de a prezenta epitopii nonself, trebuie sa permita actiunea eficienta si rapida a limfocitelor Tc.

Moleculele CMH îndeplinesc si functii *neimune*. Moleculele CMH I sunt componente ale receptorilor de hormoni. De exemplu, linia celulara stabilizata Daudi nu exprima moleculele CMH I si nu are nici receptor pentru insulina, deoarece nu sintetizeaza β 2-microglobulina.

Capitolul 5

RASPUNSUL IMUN

Organismul, ca sistem functional este echilibrat atâta timp cât informatia antigenica pe care o primeste, este identica cu cea proprie. Fata de moleculele straine, care se abat de la modelul informational propriu, sistemul imunitar raspunde prin activarea mecanismelor de recunoastere pentru a îndeparta moleculele nonself.

Ansamblul fenomenelor complexe în cascada, declansate de interactiunea specifica a sistemului imunitar cu antigenul, în cursul carora celulele imunocompetente se activeaza, prolifereaza si se diferentiaza în celule efectoare si celule de memorie, constituie raspunsul imun.

Functionalitatea sistemului imunitar se suprapune partial, modelului general al *arcului reflex*, deoarece presupune existenta unui flux informational care corespunde unui *excitant specific* (Ag) fata de un *receptor* (limfocitele), o *cale aferenta* (celulele care înglobeaza si prelucreaza Ag), un *organ central* (celulele limfoide dintr-un organ limfoid secundar) si *efectorii* raspunsului imun (anticorpi, celule efectoare).

Asemanarile dintre sistemul imunitar si sistemul nervos se extind si asupra altor particularitati:

– sistemul imunitar este dotat, ca si sistemul nervos, cu "inteligenta" (capacitatea de a receptiona un numar mare de stimuli (adica de a recunoaste un numar mare de determinanti antigenici diferiti) si de a prelucra informatie chimica. Sistemul nervos prelucreaza informatie *senzoriala,* iar sistemul imunitar recunoaste si prelucreaza informatie *moleculara.* "Inteligenta" sistemului imunitar se manifesta discontinuu, în functie de agresiunile antigenice asupra organismului;

– "educatia" sistemului imunitar (adica stocarea informatiei antigenice primita prin stimulari repetate), ca si în cazul sistemului nervos, începe dupa nastere;

– ambele sisteme "învata" prin experienta, pentru ca ambele sunt dotate cu *memorie*, care poate fi consolidata prin repetarea stimulului. Memoria ambelor sisteme este înscrisa în modificari moleculare persistente ale retelei, dar nu poate fi transmisa la descendenti;

– ambele sisteme sunt organizate dupa modelul unei *complexe retele celulare si moleculare*.

Între cele doua sisteme exista si deosebiri: sistemul nervos receptioneaza stimuli de orice natura, care actioneaza la nivelul întregului organism, iar sistemul imunitar recunoaste si reactioneaza numai la stimuli de natura moleculara, care tind sa perturbe echilibrul chimic al organismului.

PARTICULARITATILE GENERALE ALE RASPUNSULUI IMUN

Elaborarea raspunsului imun fata de o substanta nonself este un proces fiziologic care se caracterizeaza printr-o mare eficienta si suplete si are urmatoarele particularitati generale:

– functia imuna are *caracter adaptativ*, care decurge din orientarea specifica a reactiilor sale fata de o substanta nonself. Caracterul adaptativ al raspunsului imun implica mobilizarea unor celule preprogramate care asteapta sa fie activate de un anumit antigen, corespunzator specificitatii lor;

– caracterul foarte *economic* al functiei imunitare deriva din specificitatea actiunii sale. In timpul raspunsului imun se selectioneaza si se activeaza numai clonele de limfocite care au recunoscut specific epitopii antigenului, toate celelalte clone ramânând disponibile pentru alte interactiuni;

– *eficienta* functiei imune deriva din caracterul foarte economic al mijloacelor celulare si moleculare pe care le mobilizeaza si din capacitatea de a amplifica efectorii sai, pe doua cai;

a) *proliferarea masiva* (circa 8 generatii celulare) a celulelor selectionate sub actiunea stimulatoare a substantei nonself. Dupa activare se produc modificari functionale calitative ale acestor celule, de diferentiere proliferativa si maturare, rezultatul fiind generarea celulelor efectoare cu mare capacitate de actiune si a celulelor de memorie;

b) celulele efectoare *produc cantitati mari* de molecule de recunoastere, sub forma receptorilor specifici fata de substanta nonself;

– caracterul de *retea* a celulelor activate în raspunsul imun, conectate prin mediatori moleculari (interleuchine) si care conditioneaza eficienta raspunsului imun;

– celulele sistemului imunitar coopereaza stimulator cu numeroase alte categorii de celule, capabile la rândul lor sa confere rezistenta organismului. Cooperarea are loc, inclusiv cu factorii nespecifici (înascuti) ai rezistentei (fagocitele, proteinele sistemului complement, molecule bactericide sau bacteriolitice din plasma);

– raspunsul imun adaptativ necesita o *perioada de timp* pentru activarea si proliferarea limfocitelor care au recunoscut antigenul, în timp ce reactiile neadaptative sunt prompte;

– raspunsul imun adaptativ asigura *protectia* organismului si a descendentilor sai, prin transferul placentar al anticorpilor si prin secretia lactata;

– raspunsul imun adaptativ are o proprietate fundamentala unica - *memoria imuna* - consecinta a experientei antigenice individuale, netransmisibila la descendenti.

Raspunsul imun este rezultatul cooperarii unui numar restrâns de tipuri celulare si moleculare.

In functie de predominanta componentei celulare sau moleculare în compartimentul efector al raspunsului imun, se disting doua tipuri de reactivitate imunitara.

1. *Raspunsul imun mediat humoral* (RIMH), care se caracterizeaza în esenta, prin sinteza anticorpilor ca molecule efectoare. Efectele RIMH sunt urmatoarele:

– neutralizarea toxinelor si a infectiozitatii particulelor virale

– opsonizarea antigenelor celulare(bacterii, celule eucariote)

– legarea antigenelor moleculare în complexe Ag-Ac si eliminarea lor.

Imunitatea mediata humoral este transferabila de la un organism la altul prin intermediul serului. RIMH este protector fata de infectiile bacteriene (în special piogene), fata de reinfectiile virale si fata de antigenele moleculare pe care le neutralizeaza.

2. *Raspunsul imun mediat celular* (RIMC) se caracterizeaza prin aceea ca, dupa patrunderea antigenului, de regula celular, sistemul imunitar mobilizeaza celule specializate, care ataca antigenul tinta. Atacul se realizeaza fie prin contact celular direct între limfocitele T efectoare si celula tinta, fie prin mediatori moleculari.

Raspunsul imun mediat celular este declansat de antigene care se exprima pe suprafata celulelor:

– *antigene virale* exprimate pe suprafata celulelor infectate, în special dupa infectia virala primara;

– *antigene fungice*;

– antigene exprimate pe suprafata celulelor infectate de bacteriile cu localizare *intracelulara obligata* (*Rickettsia, Coxiella, Chlamydia*) sau *facultativ intracelulara* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae, Brucella sp., Listeria monocytogenes, Francisella tularensis*), în special în macrofage;

– antigenele *tumorale;*

– antigenele *celulare* din grefele de tesuturi si organe alogenice.

Existenta celor doua compartimente ale raspunsului imun este

argumentata de rezultatele experimentale, dar si de observatiile clinice, adevarate “experiente ale naturii”, asupra unor indivizi cu afectiuni determinate de incapacitatea RIMH sau RIMC.

Sindromul Di George se caracterizeaza prin aplazia congenitala a timusului si paratiroidelor. Bolnavilor le lipseste reactivitatea fata de antigenele care mobilizeaza IMC si de aceea sunt sensibili la infectiile virale, fungice si la cele produse de bacterii cu localizare intracelulara. Sinteza si titrul Ig serice sunt normale.

Hipo- si agamaglobulinemia congenitala de tip Bruton este o afectiune congenitala determinata de gena tirozin-kinazei, situata pe cromosomul X, care afecteaza diferentierea celulelor limfoide B si produce imunodeficienta X lincata (Xid). Celulele B în sânge sunt rare, desi numarul limfocitelor pre-B în maduva osoasa nu este semnificativ redus, ceea ce sugereaza o moarte celulara crescuta la tranzitia pre-B-B. Deficienta clinica consta în incapacitatea de a sintetiza anticorpi si din aceasta cauza, copiii, dupa 3-6 luni de viata, fac infectii repetate si recurente cu bacterii Gram pozitive si prezinta manifestari ale maladiilor autoimune. Reactivitatea IMC ramâne nemodificata, pentru ca organismul îsi pastreaza rezistenta fata de infectiile virale si fata de bacteriile Gram negative. Separarea celor doua compartimente ale raspunsului imun, humoral si celular, este artificiala, deoarece între ele este o conditionare reciproca si profunda: anticorpii au functie opsonizanta, favorizând astfel IMC, iar pe de alta parte, IMC este mediata de numerosi factori solubili. Cele doua compartimente interactioneaza sinergic pentru producerea unui raspuns imun eficient. Totusi, separarea este mentinuta deoarece reflecta diferentele fundamentale ale mecanismelor de actiune ale celor doua populatii de limfocite: limfocitele B pentru RIMH si limfocitele T pentru RIMC.

Nici un antigen nu induce un raspuns imun pur, humoral sau celular. Totdeauna raspunsul imun este mixt, cu predominanta unuia sau a celuilalt dintre compartimente.

ETAPELE RASPUNSULUI IMUN

Raspunsul imun este rezultatul succesiunii urmatoarelor etape:

- patrunderea antigenului în organism si înglobarea lui de catre celulele accesorii;
- prelucrarea antigenului si prezentarea epitopilor pe suprafata celulelor accesorii;
- recunoasterea specifica a componentelor nonself si activarea celulelor efectoare;

– producerea efectorilor raspunsului imun.

Patrunderea antigenului în organism se realizeaza pe diferite cai:

– pe cale cutanata

– pe calea circulatiei sanguine

– pe calea mucoaselor(respiratorie, gastro-intestinala si urogenitala).

Epiteliul tegumentar si mucoasele reprezinta o suprafata foarte mare, expusa la o mare diversitate de substante antigenice. Tegumentul este o bariera mecanica fata de cele mai multe antigene, iar mucoasele sunt protejate, în primul rând, de IgA din secretii. Epiteliul tegumentar si epiteliile mucoaselor au rol în fenomenul “excluderii antigenice”. Schimbul liber între mediul extern si cel intern are loc numai în situatii patologice.

Elaborarea raspunsului imun este, în esenta, rezultatul cooperarii a doua categorii de celule: *celulele accesorii* ale raspunsului imun si *celulele limfoide*.

Antigenul este recunoscut de celule specializate functional si înglobat, cel mai adesea prin actiunea unor mecanisme nespecifice, de *celulele accesorii, cu rolul de a prelucra si de a prezenta antigenul* .

Celulele prezentatoare de antigen (CPA)

Celulele accesorii au rol esential în elaborarea raspunsului imun, datorita capacitatii lor de a îngloba substantele straine, de a le prelucra si de a le prezenta limfocitelor, de a fagocita celulele opsonizate si de a sintetiza substante imunomodulatoare. Prezentarea antigenului este treapta obligatorie care precede recunoasterea antigenelor proteice de catre celulele T.

Orice celula care poarta pe suprafata ei molecule CMH poate sa participe la elaborarea raspunsului imun. Celulele prezentatoare de antigen au urmatoarele proprietati: preiau antigenele, le internalizeaza si le prelucreaza; exprima moleculele CMH I si II; exprima moleculele de aderenta care favorizeaza interactiunea cu limfocitele; produc molecule stimulatoare ale cresterii si diferentierii limfocitelor T; elibereaza citochine.

Cele mai importante celule accesorii pentru elaborarea raspunsului imun sunt *macrofagele*. *In vivo*, macrofagul participa decisiv la procesul de imunogeneza. Indiferent de calea de patrundere în organism, antigenele sunt captate de celule accesorii, cel mai adesea, de macrofag.

Cea mai mare parte a antigenelor circulante sunt eliminate înainte de a declansa raspunsul imun, în primul rând de celulele Kupffer,

localizate pe fata luminala a capilarelor sinusoide din ficat. La nivelul ficatului se elimina circa 90% din totalul antigenelor circulante (bacteriile care strabat bariera mucoasei digestive, endotoxinele absorbite la nivelul colonului, antigenele de origine alimentara).

Alte celule specializate, cu rol major în prezentarea antigenului sunt *celulele dendritice si limfocitele B.*

Celulele dendritice fac parte dintr-o familie care cuprinde urmatoarele tipuri de celule:

– *celulele Langerhans*, localizate în epiderm, dar si în mucoase(orala, nazala, esofagiana, bronsica, în mucoasa traheii)

– *celulele cu voal*, din limfa aferenta

– *celulele dendritice*, din epiderm, din epiteliile mucoaselor, din organele limfoide si din sânge

– *celulele interdigitate*, din aria paracorticala a ganglionilor limfatici.

Originea acestor celule nu este certa, dar se admite urmatoarea filiatie: *monocitul sanguin*, *celula Langerhans* din epiderm, *celula cu voal* din limfa aferenta ganglionului limfatic, *celula dendritica* din derm, din organele limfoide si din sânge.

Celulele *dendritice* s-au izolat din organele limfoide si din sânge, pe baza capacitatii lor de a adera de suport (ceea ce permite eliminarea limfocitelor din amestec) si de a-si pierde aderenta dupa 24 de ore de cultivare. Rolul lor în prezentarea antigenului este argumentat de faptul ca stimuleaza intens reactia limfocitara mixta.

Celulele dendritice au rol foarte important pentru initierea raspunsului imun. Sunt larg distribuite în tesuturile limfoide si nelimfoide la toate speciile de mamifere studiate. Precursorii celulelor dendritice si ai macrofagelor sunt localizati în maduva osoasa, iar *monocitul* este un stadiu comun, înainte de diferentierea pe cele doua linii. Monocitul trece în sânge, de unde se disemineaza în tesuturile nelimfoide (epiderm, epiteliul tractului respirator, gastrointestinal, urogenital) si se diferentiaza *în celula dendritica.* În tegument, *celulele dendritice si celulele Langerhans* formeaza o retea ramificata în tot epidermul. Ele au capacitati optime de captare si prelucrare a antigenelor, care patrund pe cale tegumentara. Dupa maturare, favorizata de citochinele produse local, migreaza din tesuturile nelimfoide, în tesuturile limfoide secundare. Migrarea din epitelii are loc pe cale limfatica, pâna în ganglionii limfatici regionali, iar cele din spatiile interstitiale migreaza pe cale sanguina în splina. In timus, celulele dendritice prezinta complexele CMH-peptide, timocitelor care îsi dobândesc competenta imunitara, pentru inducerea tolerantei imune.

Celulele acestei familii nu au receptori pentru Fc si nici pentru C3, dar exprima la un nivel ridicat, moleculele CMH I si II.

Celulele Langerhans reprezinta 2-8% din totalul celulelor

epidermice si formeaza o retea printre cheratinocitele straturilor profunde. Ele reprezinta celulele dendritice imature si exprima nivele mai mari de molecule CMH II. Sunt capabile sa preia antigenul exogen prin intermediul moleculelor de suprafata, fiind celule prezentatoare de antigen foarte eficiente. Celulele Langerhans pot sa prezinte antigenul local, în epiderm, sau pot sa se mobilizeze, sa paraseasca stratul bazal si sa migreze pe cale limfatica, pâna în ganglionii regionali. In timpul migrarii, celulele au prelungiri membranare si se numesc *celule cu voal*. In ganglionul limfatic, ele se distribuie în aria paracorticala(cortexul profund) si devin *celule dendritice* si *celule interdigitate* (o varianta morfologica cu prelungiri mai scurte), având rol esential în prezentarea antigenelor si activarea limfocitelor T. Celulele Langerhans, celulele cu voal si celulele interdigitate sunt stadii diferite ale liniei celulelor dendritice.

Celulele acestei familii nu au proprietati fagocitare. Totusi, li se atribuie un rol important în procesul *prelucrarii antigenelor*. Antigenele ramân legate la nivelul membranei celulare si sunt prelucrate prin intermediul *ectoproteazelor* pe care le secreta. Iradierea tegumentului cu raze UV duce la disparitia celulelor Langerhans.

Limfocitul B este celula efectoare a RIMH, dar are si rolul de captare si prezentare a antigenului specific. Eficienta sa în captarea antigenului este maxima, deoarece receptorul imunoglobulinic leaga specific epitopii corespunzatori chiar la concentratii foarte mici, de 1000 de ori mai mici decât cele necesare prezentarii sale de catre macrofag sau de catre celula dendritica.

Limfocitul B recunoaste si prezinta numai antigenele moleculare mici (peptide). Probabil ca proteinele mari nu le sunt accesibile. Exista dovezi ca antigenul peptidic legat la suprafata limfocitului B, prin intermediul receptorului imunoglobulinic specific, este endocitat, prelucrat în compartimentul acid si prezentat în asociatie cu moleculele CMH II, pentru a fi recunoscut de limfocitele T. Limfocitele B exprima nivele relativ înalte ale moleculelor CMH II. Rolul lor de captare si eventual, prelucrare a antigenului este semnificativ la contactul secundar cu antigenul.

Cele mai importante celule, cu functia de captare si prelucrare a antigenului sunt *macrofagele si celulele dendritice.*

Prima treapta a interactiunii antigenului exogen cu CPA (macrofag, celula dendritica) este legarea nespecifica, necovalenta, cu structuri nedeterminate ale suprafetei celulare. Antigenele din complexele imune sunt recunoscute de CPA prin intermediul receptorilor pentru Fc si C3.

Dupa ce a patruns în organism, antigenul este repede înglobat si

depozitat în interiorul macrofagului. Scoaterea antigenului din circulatie are o semnificatie functionala deosebita, deoarece constituie un depozit din care este eliberat treptat si stimuleaza imunogeneza. Antigenul liber în organism poate sa induca una din cele doua stari defavorabile pentru reactivitatea imunitara:

– poate fi eliminat prea rapid din organism, înainte de stimularea raspunsului imun;

– dozele prea mari de antigen liber sunt defavorabile reactivitatii imunitare, prin blocarea raspunsului limfocitelor.

Starea caracterizata prin incapacitatea de raspuns imun a organismului se numeste *paralizie imunologica.* Este o stare de blocare completa a reactivitatii imunitare prin “inundatie antigenica”.

Antigenele moleculare sau particulate cu o buna imunogenitate sunt retinute partial în macrofag sub o forma rezistenta la degradare, pentru perioade mai lungi de timp.

Macrofagele modifica imunogenitatea antigenelor: dupa legarea de macrofag, cele slab imunogene devin mai imunogene, iar cele cu imunogenitate ridicata, dupa legarea de macrofag îsi pierd partial aceasta calitate.

Prelucrarea antigenelor

Prelucrarea antigenelor exogene este o etapa obligatorie deoarece limfocitele T (Th si Tc) nu recunosc si nu preiau direct informatia antigenica nativa. Limfocitele T recunosc numai informatia antigenica prezentata pe suprafata CPA. Celulele accesorii ale raspunsului imun prelucreaza antigenele moleculare mari si pe cele particulate. Din punct de vedere biochimic, prelucrarea semnifica deplierea, clivarea proteinelor si generarea peptidelor, ca rezultat al unei proteolize partiale. Prelucrarea antigenului exogen de catre celulele prezentatoare, parcurge urmatoarele etape: *internalizarea* antigenului în veziculele membranare acide; *proteoliza* partiala; *cuplarea* cu moleculele CMH; *transportul* la nivelul membranei plasmatice.

Gradul prelucrarii antigenului este dependent de natura sa. Intervalul de prelucrare este de 45-60 minute. Durata s-a determinat prin inactivarea metabolica a macrofagelor cu paraformaldehida, la diferite intervale de timp dupa contactul cu antigenul.

Experientele cu antigen marcat au evidentiat ca în CPA, materialul imunogen are doua destinatii: o parte este expusa pe suprafata celulei si este recunoscuta de celulele T, iar o alta parte este sechestrata în celula, de unde este eliminata activ în mediul extracelular si este

preluata de alte CPA.

Principalul mecanism degradativ care are loc în CPA este *proteoliza lizosomala.* Concluzia a fost dedusa experimental: amoniacul si cloroquina (substante lizosomotrope) se acumuleaza în lizosomi si blocheaza activitatea enzimelor prin cresterea pH lizosomal. Macrofagele astfel tratate sunt incapabile sa prezinte antigenele proteice sau bacteriene. Cloroquina blocheaza numai etapa prelucrarii antigenului, dar nu si recunoasterea sa de catre limfocitele T, deoarece administrarea ei dupa o ora de la contactul macrofagelor cu antigenul, a ramas fara efect. Cloroquina a blocat prezentarea antigenului de catre celulele dendritice, desi ele nu sunt fagocitare *in vitro* si au un echipament lizosomal putin dezvoltat. S-a dedus ca ele prelucreaza antigenul la suprafata, prin intermediul *ectoproteazelor* membranare, desi nu exista dovezi directe în acest sens.

Prezentarea antigenelor si asocierea cu moleculele CMH I nu este sensibila la actiunea substantelor lizosomotrope alcalinizante.

Proteinazele cisteinice (functioneaza prin intermediari covalenti enzima-substrat) sunt importante pentru prelucrarea antigenelor proteice, asa cum s-a demonstrat cu antigene sintetice.

Proteoliza rapida si extensiva este cauza slabei imunogenitati a unor antigene (sau chiar a absentei imunogenitatii). Unele antigene sintetice (copolimerul L-acid glutamic-L-alanina) sunt mult mai imunogene dupa inhibarea actiunii proteinazelor cisteinice.

Mecanismele moleculare ale prelucrarii antigenelor sunt putin cunoscute. In macrofage se produce o *digestie selectiva a antigenului*, în urma careia o parte din epitopi se pastreaza, dar cea mai mare parte a antigenului este complet degradata.

Complexitatea antigenului conditioneaza numarul de peptide cu rol de epitopi, care deriva prin procesul de prelucrare si care pot fi legate de moleculele CMH. Daca antigenul este o bacterie, numarul de epitopi este nedeterminat si specificitatea lor antigenica este variabila, în functie de complexitatea aparatului enzimatic hidrolitic al celulei care prelucreaza antigenul.

Nu toate antigenele necesita proteoliza (fragmentarea) prealabila recunoasterii de catre celulele T. Uneori este suficienta numai *denaturarea* (deplierea) proteinelor pentru ca antigenul sa fie prezentat de CPA, chiar tratate cu cloroquina.

Forma sub care limfocitele T recunosc antigenele, depinde atât de natura CPA, dar în special de natura antigenului.

Majoritatea proteinelor sunt rapid endocitate si prelucrate, dar unele sunt legate de membrana celulei si prezentate în stare *nativa,* fara o prelucrare prealabila. Antigenele peptidice mici (insulina, angiotensina)

pot fi recunoscute în forma nativa, de unele subpopulatii de limfocite T, în timp ce altele recunosc formele prelucrate ale acelorasi antigene.

Dimensiunea si configuratia spatiala a moleculei de antigen sunt hotarâtoare în ceea ce priveste gradul prelucrarii sale, înainte de a fi prezentat. De regula, moleculele mari necesita prelucrarea prealabila, iar cele mici sunt prezentate în forma nativa.

Forma chimica a antigenului, dupa prelucrare, nu este cunoscuta cu certitudine. Foarte probabil, este un *polipeptid* de dimensiuni mici (9-20 aminoacizi).

Dupa alti autori, prelucrarea nu este necesara pentru ca antigenul sa fie prezentat limfocitelor T, dar totdeauna este necesara conversia sa la o forma care sa-i permita interactiunea cu moleculele CMH II ale CPA si cu receptorii limfocitelor T. Dovada este adusa de faptul ca liposomii cu molecule CMH II inserate în stratul lipidic, la care s-au atasat o varietate de antigene proteice native, stimuleaza clonele de limfocite T *in vitro*, în absenta completa a CPA.

Epitopii antigenelor peptidice *exogene* sunt expusi la suprafata CPA, în asociatie cu moleculele CMH clasa II, iar epitopii antigenelor de origine *endogena* sunt prezentati în asociatie cu moleculele CMH clasa I.

Rolul moleculelor CMH în prezentarea antigenelor

Raspunsul imun este rezultatul interactiunilor complexe între celulele care prezinta antigenele si limfocitele T si B.

Prezentarea antigenelor este o etapa obligatorie a elaborarii raspunsului imun, ce deriva din faptul ca limfocitele nu interactioneaza direct cu antigenele în stare nativa, ci numai dupa ce acestea au fost prelucrate si prezentate pe suprafata unei celule.

Moleculele CMH îndeplinesc functia de prezentare a antigenelor si au un rol esential în declansarea raspunsului imun.

Pentru a deveni disponibili interactiunii cu receptorii de antigen ai limfocitelor, epitopii sunt asociati intracelular, cu moleculele CMH I sau II si sunt transportati la suprafata CPA ca fragmente peptidice sau ca proteine intacte, în functie de natura si de marimea antigenului.

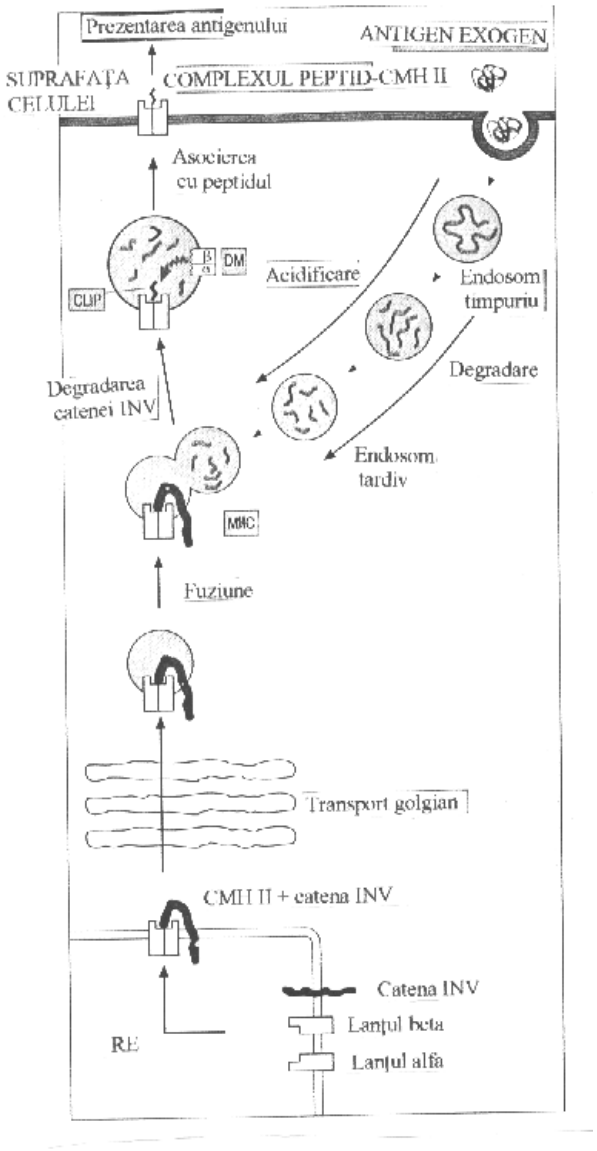


Fig. 56. *Prelucrarea si prezentarea antigenului exogen,* în asociatie cu moleculele CMH II. Moleculele CMH II, cu catena invarianta, sunt asamblate în reticulul endoplasmic (RE) si transportate prin reteaua Golgi, de unde sunt orientate spre vezicula endosomala, care contine proteina degradata partial, derivata din antigenul exogen. Degradarea catenei invariante, face posibila asocierea peptidului antigenic cu molecula dimerica (DM). Complexul este transportat la suprafata celulei si este recunoscut de limfocitele Th.

Moleculele CMH I si II au capacitatea functionala de a lega si de a expune pe suprafata celulei, un numar neli-mitat de peptide diferite. Complexul format de mo-leculele CMH I sau II si epitopul peptidic este recu-noscut de limfocitele T.

Nu se cunoaste modalitatea interactiunii dintre moleculele CMH si epitopii antigenici. Ar putea fi o interactiune ferma sau moleculele CMH au numai rolul de suport pentru epitopii antigenici.

Se accepta ideia unei ierarhii a epitopilor cu privire la ordinea legarii competitive de moleculele CMH, dato-rita sensibilitatii diferen-tiate la proteaze. Rezulta peptide cu afinitate diferita fata de situsul de legare a moleculelor CMH. Astfel, exista epitopi *dominanti*, care se asociaza cu mare probabilitate de moleculele CMH, epitopi *subdominanti*, cu mai putine sanse de asociere cu moleculele CMH si epitopi *criptici*, care se asociaza rareori în complexe cu moleculele CMH si care nu devin accesibili limfocitelor T potential reactive.

Antigenele exogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH II.

Moleculele CMH II leaga peptide derivate din proteinele exogene endocitate de celule: proteine solubile, proteine ale capsidei virale, proteine bacteriene sau proteine ale protozoarelor endocitate de celula. *In vitro*, s-a demonstrat ca moleculele CMH II purificate, leaga suficient de stabil o molecula peptidica, pentru a fi izolate împreuna prin gel-filtrare.

Antigenele exogene sunt înglobate si prelucrate în fagolizosomii celulelor prezentatoare de antigen (CPA). Moleculele CMH II se sintetizeaza în reticulul endoplasmic granular si sunt modificate post-traducere, în cisternele Golgi. Cele doua catene ale moleculei sunt reunite prin *catena invarianta*. Asocierea este mentinuta pâna când moleculele CMH II ajung în sistemul endocitar al celulei. In drumul lor spre suprafata celulei, moleculele CMH II ajung prin fuziunea veziculei transportoare, în compartimentul *fagolizosomului* ce contine antigenul partial degradat. La acest nivel este eliminata *catena invarianta* ce reuneste catenele α si β si care ocupa situsul de legare a antigenului. Moleculele CMH II se asociaza cu peptidul antigenic de 13-25 aminoacizi. Complexul format este expus la nivelul membranei, unde este recunoscut de limfocitele TCD_4. Situsul de legare al moleculei CMH II este o cavitate formata prin β-plierea domeniilor α-1 si β-1, delimitata de secventele α-helicale ale domeniilor α-1 si β-1. Complexul format este recunoscut de limfocitele TCD_4.

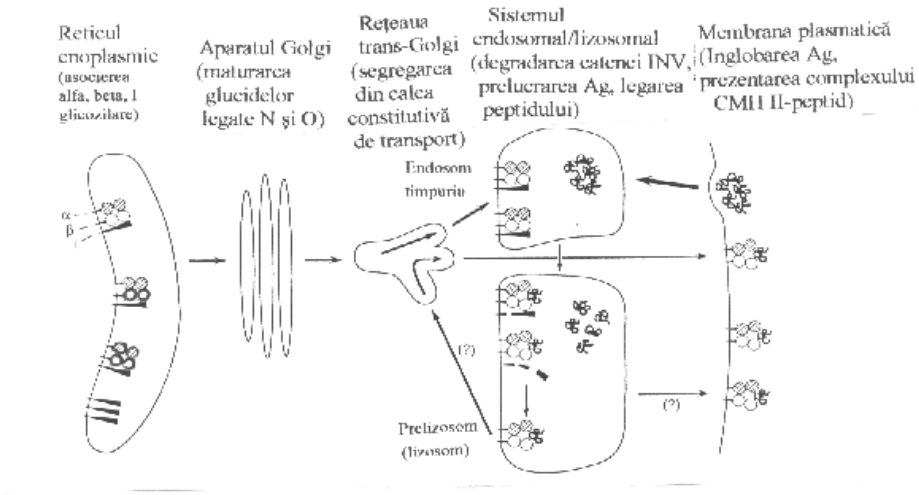

Reticul endoplasmic (asocierea alfa, beta, I glicozilare)
Aparatul Golgi (maturarea glucidelor legate N şi O)
Reţeaua trans-Golgi (segregarea din calea constitutivă de transport)
Sistemul endosomal/lizosomal (degradarea catenei INV, prelucrarea Ag, legarea peptidului)
Membrana plasmatică (Inglobarea Ag, prezentarea complexului CMH II-peptid)
Endosom timpuriu
(?)
(?)
Prelizosom (lizosom)

Fig. 57. Reprezentarea schematica a *asocierii moleculelor CMH II cu peptidul antigenic* (dupa Cresswell, 1994).

Moleculele CMH II au functia fundamentala de a stimula elaborarea raspunsului imun specific fata de antigenele exogene, prin intermediul limfocitelor TCD_4. Limfocitele TCD_4 secreta IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ, cu efect stimulator fata de limfocitele Tc si B.

Asocierea unui peptid nonself cu moleculele CMH II semnifica "cererea de ajutor" pentru eliminarea antigenului, materializat în activarea limfocitelor TCD_4 si secretia de limfochine stimulatoare ale raspunsului imun.

Moleculele CMH II au rol esential pentru stimularea raspunsului imun, dar si pentru reglarea intensitatii sale. Interactiunea moleculelor CMH II cu epitopii antigenici nu este specifica.

Deoarece moleculele CMH sunt polimorfe, exista diferente, uneori importante, între organismele outbred ale unei specii de a raspunde la un antigen. Astfel se explica diferentele individuale de sensibilitate fata de un agent infectios. Un raspuns imun mai amplu, este generat de un organism care expune mai multi epitopi antigenici diferiti, asociati cu diferitele variante de molecule CMH II, comparativ cu un organism care expune mai putine fragmente antigenice asociate cu 1 sau 2 tipuri de molecule CMH II.

Antigenele endogene sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH I

Rolul moleculelor CMH în procesul recunoasterii antigenelor care se sintetizeaza în interiorul celulei (proteine *endogene*), a fost demonstrat de Zinckernagel si Doherty (1974), pentru antigenele virale, în experiente de genul urmator:

– soarecii liniei inbred D au fost inoculati cu virusul coriomeningitei limfocitare (cu specificitate antigenica A), pentru a stimula proliferarea limfocitelor Tc fata de celulele infectate cu acest virus;

– culturile de fibroblaste de la embrionii liniei D se infecteaza cu varianta antigenica A si respectiv B, iar fibroblastele liniei K se infecteaza cu varianta antigenica A;

– limfocitele Tc ale organismelor liniei D, stimulate cu virusul A, recunosc si lizeaza, *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu varianta antigenica A, dar nu recunosc si nu lizeaza fibroblatele liniei D infectate cu varianta antigenica B si nici fibroblastele liniei K, infectate cu varianta antigenica A.

Concluzia a fost ca nucleoproteinele citosolice virale, sintetizate în celula, pot deveni tinta celulelor Tc, dupa ce sunt expuse ca un peptid prelucrat, în asociatie cu moleculele CMH I ale celulei infectate. Pe baza acestei concluzii s-a stabilit principiul general ca proteinele intracelulare (care nu sunt destinate membranei citoplasmatice), pot sa-si semnaleze prezenta în raport cu celulele T, prin expunerea asociata cu moleculele CMH I. Rezultatele au fost extrapolate si pentru categoria larga a antigenelor exogene.

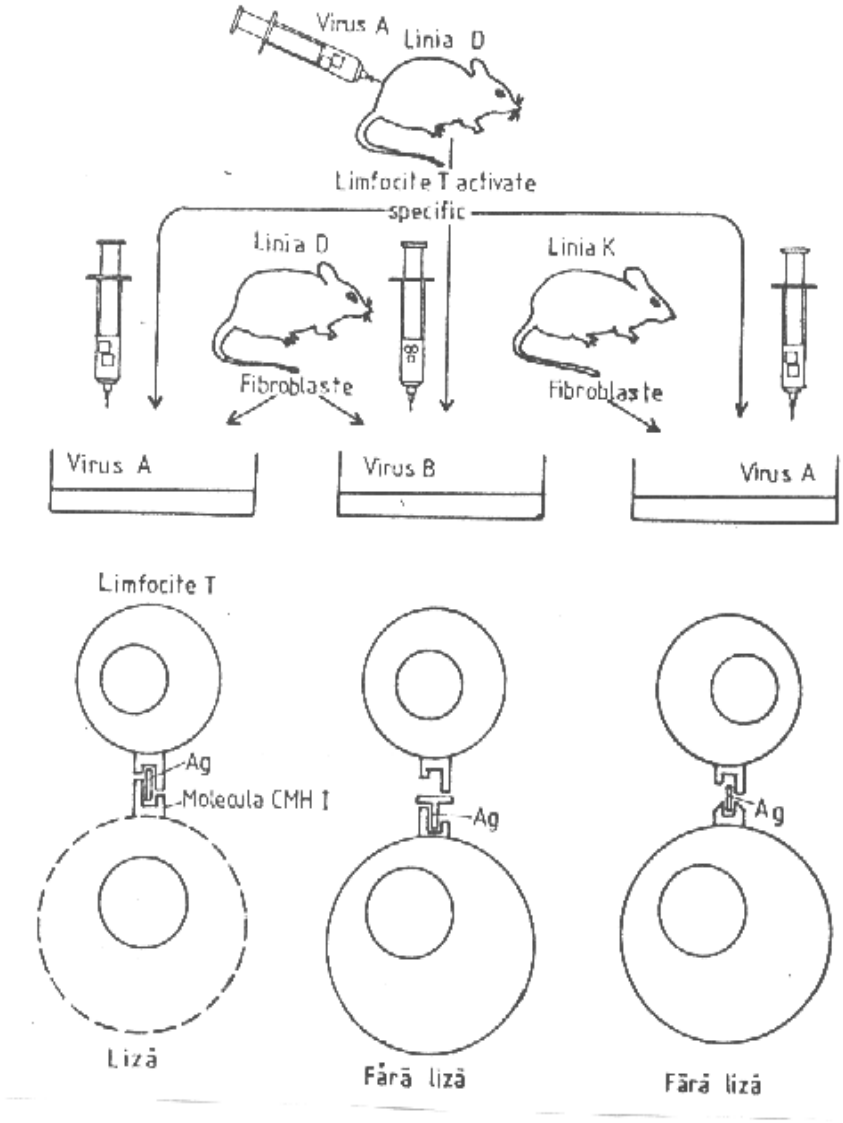


Fig. 58. *Actiunea limfocitelor Tc* este restrictiva în raport cu moleculele CMH I, deoarece celula Tc recunoaste atât antigenul specific, cât si molecula CMH I. Amanunte în text.

Recunoasterea asociata a antigenelor cu moleculele CMH I sau II are doua semnificatii majore:

– celulele sistemului imunitar interactioneaza cu proteinele proprii, numai daca acestea sunt asociate cu un determinant antigenic nonself,

de origine virala, tumorala sau indus de agenti chimici;

– recunoasterea antigenului este conditionata de existenta fenomenului de histocompatibilitate, adica celulele care prezinta antigenul si cele care îl recunosc (limfocitele Tc si Th) trebuie sa poarte molecule CMH identice, adica celulele care interactioneaza trebuie sa apartina aceluiasi organism sau unor organisme genetic identice(ale aceleiasi linii inbred). Acesta este *fenomenul de restrictie* (limitare) a interactiunilor celulare prin moleculele CMH.

Moleculele CMH I au rolul de a lega si de a prezenta proteine self, peptide derivate din catabolismul proteinelor citosolice, antigene bacteriene sau ale parazitilor intracelulari, antigene virale sintetizate în celula prin traducerea unui ARNm viral, antigene tumorale sau antigene a caror sinteza a fost indusa de agenti chimici. Dupa asocierea cu epitopi antigenici, moleculele CMH I devin tinta atacului limfocitelor TCD_8.

Limfocitele Tc sunt implicate, în primul rând, în recunoasterea si eliminarea celulelor infectate cu virusuri sau a celor transformate malign. Ambele tipuri de antigene sunt sintetizate în celula si sunt considerate ca având origine *endogena*.

Evenimentele celulare al caror rezultat este prezentarea peptidelor, se succed în urmatoarele trepte:

– catabolismul antigenului proteic (în citoplasma)

– transportul peptidului din citosol, în cisternele reticulului endoplasmic

– asamblarea complexului format din peptid si molecule CMH I

– transportul complexului la suprafata celulei.

Antigenele endogene se asociaza cu moleculele CMH I, chiar în cisternele reticulului endoplasmic granular. La acest nivel, moleculele CMH II sunt inaccesibile asocierii cu epitopii antigenici, deoarece catenele α si β sunt reunite prin catena invarianta.

Prezentarea antigenelor *endogene*, asociate cu moleculele CMH I nu este sensibila la actiunea agentilor lizosomotropi alcalinizanti (amoniac, cloroquina), dar este sensibila la derivatii peptidici(di- sau tripeptide aldehidice) care inhiba *proteasomul*. Proteasomul este un complex proteic multicatalitic, compus din mai multe subunitati inelare suprapuse, asamblate într-o structura cilindrica, în care se produce proteoliza moleculelor proteice citosolice conjugate cu ubicvitina. Proteasomul este o structura care controleaza turn-overul proteinelor citosolice, inclusiv al factorilor de transcriere si al ciclinelor. Ubicvitina este un polipeptid mic, care este asociat pe cale enzimatica dependenta de ATP, de lizina proteinelor citosolice. Legarea ubicvitinei produce deplierea proteinei tinta si asigura recunoasterea de catre elementele complexului proteasomic citosolic. Proteinele celulare modificate dupa cuplarea cu ubiquitina, devin sensibile la proteoliza. Proteoliza are loc în

mediul apos al structurii cilindrice si este independenta de ATP. Astfel sunt protejati constituientii celulari de degradarea necontrolata. Peptidele rezultate în proteasom sunt foarte rapid degradate în citoplasma. De aceea s-a presupus ca ele se asociaza cu proteinele *chaperone*, cu rol protector si de orientare a peptidelor în lumenul reticulului endoplasmic.

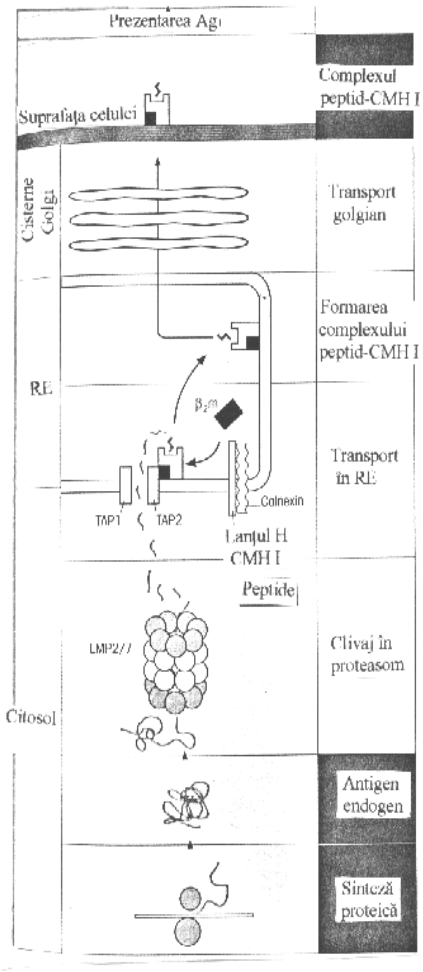


Fig. 59. *Prelucrarea si prezentarea* antigenului endogen, de catre moleculele CMH I. Proteinele citosolice sunt degradate de complexul proteosomic, în peptide care sunt transportate în reticulul endoplasmic (RE). La acest nivel, β-2 m induce diso-cierea catenei H de proteina chaperone (calnexina). Se asambleaza molecula CMH I si se asociaza cu peptidul antigenic. Complexul peptid-CMH I se elibereaza din asocierea cu transportorul TAP, traverseaza cisternele Golgi si se exprima pe suprafata celulei, gata sa fie recunoscut de RCT. Celulele deficiente în TAP1/2 nu elibereaza peptidele pentru

a se asocia cu moleculele clasa I si nu pot exercita efectul citotoxic asupra tintei (dupa Roitt, 1997).

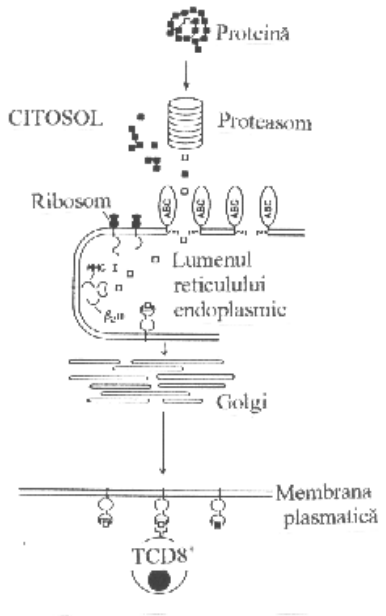


Fig. 60. Formarea *complexului CMH I-peptid* în cisternele RE.

Peptidele rezultate din prelucrarea antigenelor endogene sunt transportate în reticulul endoplasmic, de o categorie de proteine transportoare, denumite TAP (pro-teine transportoare asociate cu prezentarea antigenului) care folosesc energia rezultata din hidroliza ATP, pentru a transporta prin membrane diferite proteine, ioni, antibiotice. Molecula TAP este un heterodimer, format din doua subunitati (TAP_1 si TAP_2). Fiecare subunitate are o regiune hidrofoba N-terminala transmembranara si un domeniu C-terminal ce leaga ATP. Moleculele TAP au capacitatea de a transloca peptidele prin membrana RE.

Catenele moleculei CMH I se sintetizeaza separat pe cisternele RE si odata cu traducerea sunt transportate în RE. Catena H, β-2 m si peptidul se asambleaza într-un complex, chiar în cisternele RE sau în compartimentul pregolgian. În cisternele Golgi, catena H este glicozilata, iar complexul CMH I-peptid este ancorat în membrana si expus la suprafata celulei. Moleculele CMH I leaga peptide mici, de 8-10 aminoacizi. Specificitatea de legare este larga. Molecule CMH I identice

leaga peptide diferite.

Liniile celulare care nu sintetizeaza β-2 m, nu exprima molecule CMH I pe suprafata lor. Acesta este un exemplu al functiei de “control de calitate” pe care îl are RE. Moleculele CMH pliate incorect nu sunt transportate la nivelul membranei, ci ramân în cisternele RE si sunt degradate. Absenta β-2 m determina plierea gresita si degradarea catenei mari. Controlul de calitate este mediat de un set de proteine *chaperone*, care se asociaza reversibil cu proteinele pliate incorect si astfel permit “corectarea” greselii de pliere.

La nivel membranar, complexul molecular este recunoscut de limfocitele Tc si rezultatul interactiunii este *liza celulei tinta.*

Moleculele CMH I nu disting între peptidele self si nonself. Peptidele asociate cu moleculele CMH I au fost izolate, fractionate prin HPLC (high-performance liquid chromatography) si secventiate. Fiecare celula expune pe suprafat a, sute de peptide, cele mai multe fiind proteine citosolice autologe.

Asocierea moleculei CMH I cu un peptid nonself pe suprafata celulei, semnifica necesitatea *distrugerii* celulei tinta. Dovada în favoarea acestei ipoteze este adusa de faptul ca, *in vivo*, situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, adica fragmente ale proteinelor proprii, pe care celulele le capteaza din spatiul interstitial sau le produc în proteasom si le prezinta ca si pe cele nonself.

Dupa disocierea peptidului, molecula CMH I “goala” expusa la suprafata celulei, este instabila.

Faptul ca situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, este în acord cu teoria *supravegherii imune*, conform careia, celulele killer si limfocitele Tc controleaza permanent suprafata celulelor organismului, pentru a detecta eventuala aparitie a antigenelor tumorale sau virale. Celulele care exprima pe suprafata lor molecule nonself, sunt eliminate prompt.

Deoarece celulele prelucreaza si prezinta continuu molecule proprii, celulele sistemului imunitar sunt *stimulate permanent*. Limfocitele controleaza calitatea moleculelor CMH I si detecteaza celulele ce prezinta molecule alterate sau molecule nonself.

Indivizii umani deficienti ai moleculelor CMH I, nu par a avea o incidenta crescuta a infectiilor virale severe, ceea ce sugereaza existenta si a altor mecanisme de recunoastere a moleculelor nonself, neasociate cu moleculele CMH I.

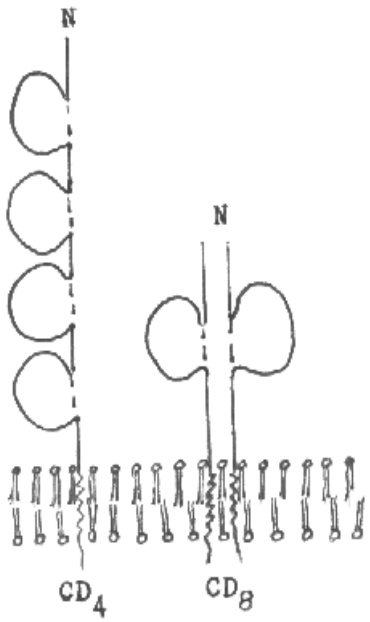


Fig. 61. Reprezentarea schematica a moleculelor CD_4 si CD_8.

Modelul recunoasterii antigenului de catre limfocitele T

Recunoasterea antigenului de catre limfocitele T este mediata în primul rând, de receptorul de antigen (RCT). Secventele hipervariabile ale lanturilor α si β formeaza regiunile determinante de comple-mentaritate (RDC 1 si RDC 2). Buclele RDC 1 si RDC 2 ale regiunilor variabile (V) α si β ale RCT, interactioneaza cu regiunea α helicala a moleculei CMH, iar cele doua secvente RDC 3, interactioneaza cu peptidul antigenic.

Interactiunea limfocitului cu celula prezentatoare de antigen este mediata si de alte molecule.

Limfocitele Tc prezinta pe suprafata lor, markerul CD_8 si recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH I, iar limfocitele Th prezinta markerul CD_4 si recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH II. Moleculele CD_4 si CD_8 sunt proteine membranare, monomorfe, participante la recunoasterea complexelor CMH-peptide, de pe suprafata celulelor tinta. Domeniile lor extracelulare, prin secventa aminoacizilor, se aseamana cu domeniile imunoglobulinelor.

Molecula CD_4 este monomerica si este pliata în 4 domenii extracelulare, omologe cu ale moleculei de Ig, stabilizate prin punti S-S.

CD_8 este o proteina dimerica, iar conformatia sa spatiala prezinta un domeniu asemanator domeniului variabil al moleculei de imunoglobulina.

În procesul recunoasterii antigenului, molecula CD_8 se asociaza cu domeniul constant α-3, al moleculei CMH clasa I, iar molecula CD_4 se asociaza cu domeniile constante α-2 sau β-2 ale moleculei CMH clasa II-a.

Moleculele CD_8 si CD_4 sunt importante nu numai pentru orientarea limfocitelor spre tintele adecvate, dar au si rol în transducerea semnalului, deoarece cozile lor citosolice leaga o tirozin-kinaza, cu rol esential în transmiterea semnalului activator al limfocitului T.

Receptorul de antigen al limfocitelor T recunoaste fragmentele peptidice complexate cu moleculele CMH I sau II. Pentru fiecare organism, diversitatea moleculelor CMH este limitata, dar ele leaga o larga varietate de peptide scurte (8-9 aminoacizi, pentru moleculele CMH I si circa 14 aminoacizi, pentru moleculele CMH II). Desi nu este o legare pe baza specificitatii, interactiunea peptidului antigenic cu moleculele CMH este caracterizata de o afinitate înalta, deoarece se stabileste cu gruparile NH_2 si COOH de la extremitatea peptidului, restul secventei de aminoacizi ramânând disponibili pentru interactiunea cu RCT.

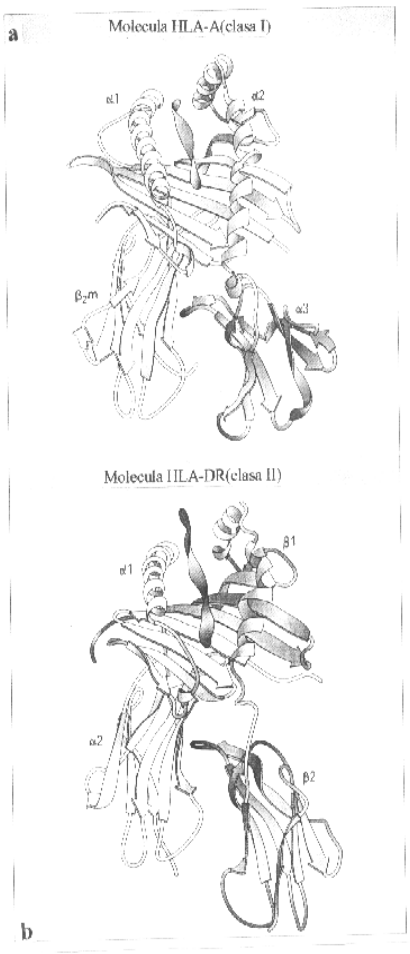


Fig. 62. Diagrama domeniilor extracelulare ale *moleculelor CMH clasa I* (sus) si *clasa II* (jos). Situsurile de legare ale celor doua clase de molecule au configuratii tridimensionale asemanatoare si sunt ocupate de peptidul rezident self sau nonself (dupa Roitt, 1993).

Deoarece moleculele CMH I si II leaga peptide scurte, epitopii celulelor T sunt alcatuiti din secvente peptidice lineare, adica configuratia epitopilor nu este dependenta de conformatia proteinei native. Deoarece epitopii recunoscuti de limfocitele T sunt peptide scurte, rezulta ca prelucrarea proteolitica a antigenelor este o etapa obligatorie, care precede interactiunea lor cu limfocitele T.

Prezentarea antigenelor aso-ciate cu moleculele CD 1

Antigenele nepeptidice sunt prezentate celulelor T, prin alte mecanisme. Moleculele CD_1 se aseamana structural cu moleculele CMH I. Ele prezinta antigenele în asociatie cu domeniile hidrofobe, care formeaza cavitati, capabile sa lege antigenele lipidice si glico-peptidice. În aceasta asociatie, antigenele sunt recunoscute de limfocitele T. Se cunosc 4 izo-forme distincte de molecule CD_1 (CD_1a, -b, -c, -d), codificate de 5 gene situate pe cromosomul 1. Prezentarea antigenelor lipidice în asociatie cu moleculele CD_1 este sensibila la agentii de acidificare a endosomului (cloroquina, concana-micina A). Probabil, asocierea antigenelor lipidice cu cu CD_1 se produce în compartimentul endo-somal acid.

Moleculele CD_1 sunt impor-tante pentru reactiile de aparare anti-infectioasa, pentru ca ele prezinta antigenele de micobacterii (acidul micolic, lipoarabinomananul), celulelor T.

Calea CD_1 de prezentare a antigenelor se aseamana cu caile de prezentare a antigenelor peptidice în asociatie cu moleculele CMH I si II. CD_1 este asemanatoare din punct de vedere structural, cu moleculele CMH I, dar asocierea cu antigenul are loc în endosomul lipidic. Prezentarea antigenelor în asociatie cu moleculele CD_1 este considerata ca o cale distincta.

Activarea limfocitelor T

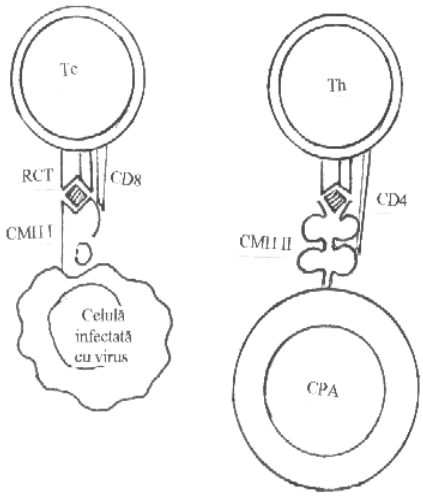


Fig. 63. Moleculele CMH regleaza raspunsul imun. **a**. O celula T citotoxica (CD_8) recunoaste peptidul în asociatie cu o molecula CMH clasa I, pe suprafata unei celule infectate cu un virus.
b. O celula T helper (CD_4) recunoaste peptidul antigenic asociat cu o molecula CMH clasa II, pe suprafata unei celule prezentatoare de antigen (CPA). Epitopii antigenici sunt recunoscuti de RCT, dar la procesul recunoasterii participa si moleculele CD_8 si respectiv CD_4. CD_8 recunoaste domeniul α-3 al moleculei CMH I, iar CD_4 se leaga de domeniile α-2-β-2 ale moleculei CMH II.

Cel putin trei molecule distincte sau complexe moleculare, fizic independente, ale membranei au rol în transducerea eficienta a semnalului activator al celulei T, fiecare fiind asociata cu o activitate enzimatica relevanta:

– RCT α-β si complexul CD_3 (γ-δ-ε). Partea invarianta a RCT este asociata cu tirozin-chinaza $p59^{fyn}$;

– coreceptorii CD_4 sau CD_8, asociati cu tirozin-chinaza $p56^{lck}$;

– CD_{45}, cu activitate fosfatazica tirozin-specifica.

Limfocitele T mature cu RCT α-β sunt CD_4 sau CD_8. Celulele TCD_4 recunosc fragmentele peptidice legate de moleculele CMH II, iar celulele TCD_8 recunosc fragmentele peptidice legate de moleculele CMH I. Aceasta specificitate a condus la sugestia ca molecula CD_4 poate sa lege molecula CMH II, iar molecula CD_8 leaga molecula CMH I, ambele având rol de *coreceptori* de antigen.

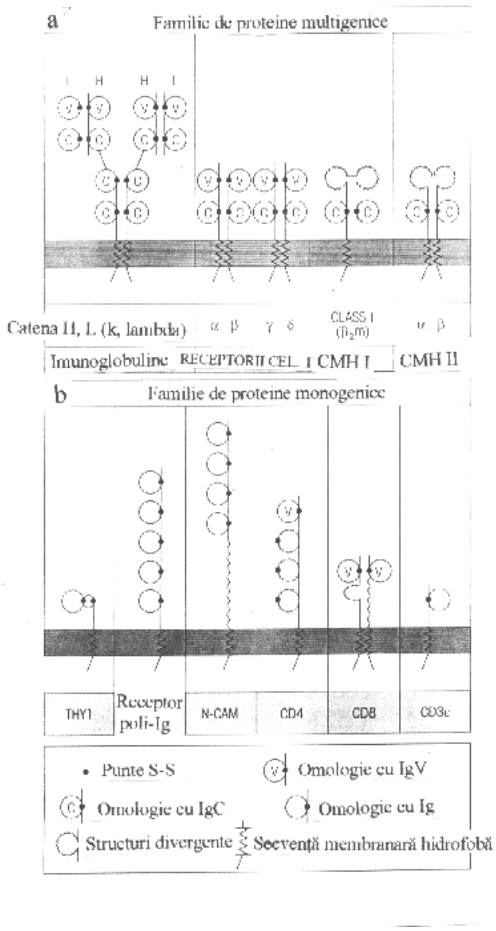


Fig. 64. **a**. *Suprafamilia genelor* care codifica imunoglobulinele si diferite alte molecule cu rol în recunoasterea intercelulara. Toate aceste molecule au o structura asemanatoare. Familia moleculelor multigenice, cu rol în recunoasterea antigenului cuprinde imunoglobulinele, RCT, moleculele CMH I si II.
b. Familia moleculelor monogenice cuprinde *molecula Thy* (exprimata pe celulele T si pe neuroni), *receptorii de poli-Ig* (transporta IgA prin epiteliul mucoaselor), *N-CAM* (o molecula de aderenta a neuronilor), *CD_4, CD_8*, precum si alte proteine (o proteina plasmatica umana, o proteina neurocitoplasmatica) (dupa Roitt, 1997).

Coreceptorii CD_4 si CD_8 sunt glicoproteine trans-membranare. Fiecare este aso-ciata cu o molecula de tirozin-kinaza specifica celulei T, $p56^{lck}$. In procesul activarii celulei T de catre antigen, coreceptorul trebuie sa se lege de aceiasi molecula CMH ca si RCT, pentru transducerea optima a semnalului. Inter-actiunea faciliteaza

transmi-terea semnalului activator cu o eficienta de pâna la 300 de ori mai mare.

CD_4 si CD_8 sunt mem-bre ale suprafamiliei imuno-globulinelor. Desi ambele au rol de coreceptori si se asociaza cu aceiasi tirozin-kinaza ($p56^{lck}$), nu au omologie structurala.

Studiile de cristalografie cu raze X au aratat ca domeniul extern al moleculei CD_4 for-meaza o protruzie pe fata laterala a moleculei, implicata în legarea moleculei CMH II.

Molecula CD_8 este formata din doua catene diferite (α si β) si are un singur domeniu de omologie cu molecula de Ig, la capatul amino. Acesta este urmat de o secventa cu configuratie nedefinita si cuprinde resturile de cisteina care permit legarea moleculelor în dimeri functionali. Molecula CD_8 are rol de coreceptor, participând la recunoasterea antigenului, prin asocierea cu domeniul α-3 al moleculei CMH I.

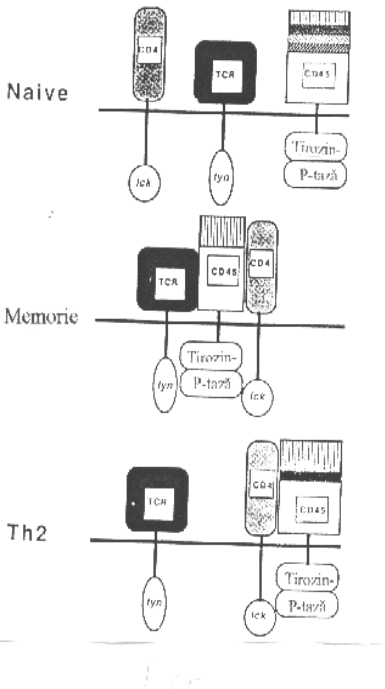


Fig. 65. Diferite aranjamente ale *RCT si ale co-receptorilor* sai sunt determinate de izoformele lui CD_{45} exprimate pe celula T. Pe celulele neangajate, CD_4, CD_{45} si RCT migreaza independent pe suprafata celulei. Pe celulele T de memorie, cele trei molecule sunt asociate. Pe celulele Th2 clonate, o izoforma de CD_{45} cu gr. mol mica, se leaga de CD_4, dar acest complex nu se asociaza cu RCT. Activarea optima a celulei are loc în cazul în care cele trei molecule sunt asociate strâns pe suprafata limfocitului (dupa Janeway, 1997).

Coreceptorii se asociaza fizic cu RCT în timpul activarii celulei T.

Molecula CD_{45} este o fosfataza transmembranara tirozin-specifica. Este un antigen leucocitar, prezent pe toate celulele de origine hematopoietica, alcatuit dintr-un domeniu extern variabil si un domeniu citoplasmatic constant ce consta din doua subdomenii cu activitate fosfatazica tirozin-specifica.

CD_{45} prezinta mai multe izoforme, care variaza cu tipul celular. Varia-bilitatea rezulta din clivarea alternativa a ARNm. Celulele T îsi schimba izoforma de CD_{45} în timpul activarii si dupa activare. Pe limfocitele T neangajate, izoformele de CD_{45} sunt toate cu greutate moleculara mare, iar celulele T activate sau de memorie exprima o varianta a CD_{45} cu greutate moleculara mica.

Izoformele distincte se asociaza în mod diferit cu celelalte componente ale complexului la celulele neangajate si la cele de memorie, modificând eficienta transmiterii semnalului de activare.

Limfocitele TCD_4 recunosc com-plexul molecular CMH II-epitop, expus la suprafata celulei prezentatoare de antigen (CPA) si se activeaza. Limfocitul activat secreta IL-2, o interleuchina esentiala pentru expansiunea clonala a limfocitelor TCD_4 si amplificarea raspunsului imun. Amplificarea raspunsului imun parcurge mai multe etape:

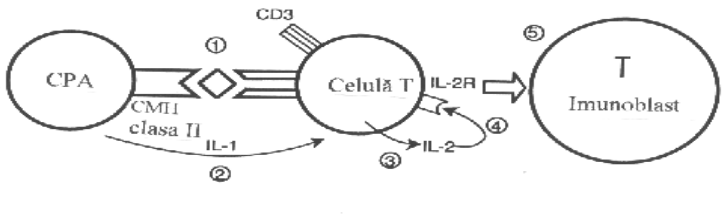


Fig. 66. Mecanismul *activarii* celulei T.

– dupa legarea limfocitului TCD_4 de CPA, ultima produce IL-1;

– stimuleaza limfocitul TCD_4 sa produca IL-2. IL-2 actioneaza stimulator asupra celulelor care o produc (bucla autocrina) si asupra limfocitelor învecinate, care au aceiasi specificitate a receptorului de antigen (actiune paracrina), efectul fiind exprimarea intensa a receptorilor pentru IL-2 pe suprafata limfocitelor stimulate;

– limfocitele TCD_4 activate de IL-2 prolifereaza si genereaza o populatie de celule imunoreactive, Th1 si Th2, care la rândul lor, prin

intermediul interleuchinelor pe care le secreta, au efecte activatoare asupra compartimentului imunitatii celulare sau stimuleaza activarea si proliferarea limfocitelor B specifice, în functie de natura antigenului.

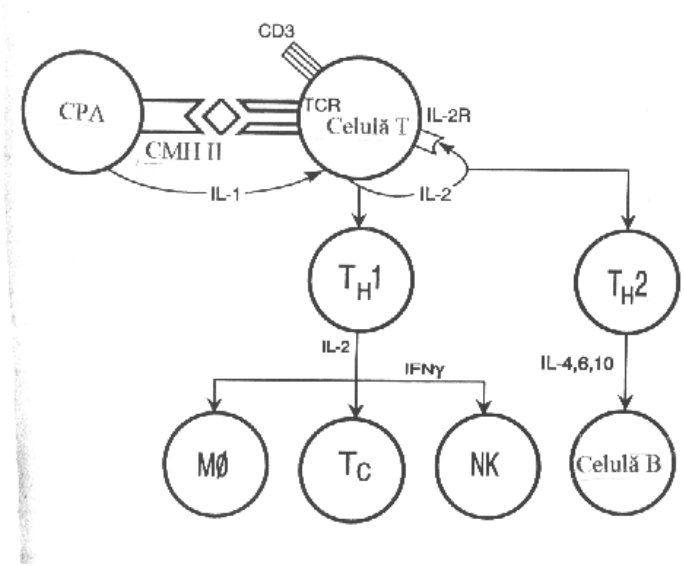


Fig. 67. Amplificarea raspunsului imun.

Pentru ca epitopii sa fie recunoscuti, moleculele CMH trebuie sa expuna simultan pe suprafata celulei, un numar mare de peptide nonself, pentru un interval suficient, astfel încât sa permita limfocitelor T sa controleze calitatea moleculelor CMH ale fiecarei celule.

Timpul de generatie al unei celule T, dupa stimularea antigenica poate fi de 4,5 ore, adica într-o saptamâna, dintr-o singura celula T pot sa rezulte 10^{12} celule, ceea ce ar însemna dublarea numarului de limfocite T în organism. O proteina de dimensiuni medii, cu 2-10 epitopi, poate fi recunoscuta de 10-1000 celule neangajate, în functie de capacitatea moleculelor CMH de a prezenta epitopii peptidici. Consecutiv unei infectii virale, numarul celulelor CD_8 cu specificitate fata de antigenele virale, la soarece poate sa creasca de 10 ori.

Durata de viata a limfocitelor T este greu de evaluat, dar moartea lor prin apoptoza este declansata de IL-2 si de antigen. Dupa stimularea ciclului celular sub actiunea antigenului, limfocitele T devin foarte sensibile la apoptoza. Proliferarea celulelor T este stimulata dupa ce IL-2 se fixeaza pe receptorul specific. Dupa unul sau câteva cicluri,

limfocitele T în faza G_1 sau S, devin foarte sensibile la apoptoza. Asa se explica moartea hibridoamelor T ca raspuns la legarea încrucisata a RCT.

Apoptoza celulelor T este declansata în doua situatii: sub actiunea stimulatoare a antigenului si în absenta limfochinelor.

Raspunsul celulelor T la antigen se desfasoara în doua faze, cu evenimente moleculare distincte: faza de *activare* si cea de *proliferare*.

Faza de activare consta în inducerea genelor pentru sinteza IL-2 si a receptorului de mare afinitate pentru IL-2. In aceasta faza, apoptoza este practic absenta. Faza de proliferare a limfocitelor T este initiata de fixarea IL-2 pe receptorul sau. Dupa ce celulele T au parcurs unul sau câteva cicluri celulare si intra în faza G_1 sau S, devin foarte sensibile la apoptoza. Factorul esential al apoptozei este IL-2.

Conceptul controlului feed-back al intensitatii raspunsului imun prin fenomenul apoptozei (reglarea propriocida) s-a nascut din nevoia de a explica acest nou rol al IL-2, care contrasteaza cu proprietatile sale proliferative. Teoria afirma ca IL-2 confera celulelor T, sensibilitate la apoptoza. Gradul stimularii antigenice determina inducerea apoptozei. Dupa încetarea stimularii antigenice, sinteza IL-2 si a receptorului sau scade. In absenta IL-2, cu rol trofic pentru limfocitele T, se initiaza *apoptoza pasiva*. Invers, daca celulele T intrate în ciclul diviziunii sunt intens stimulate de antigen, se produce *apoptoza activa* (indusa de antigen).

Apoptoza pasiva diminua expansiunea populatiei celulelor T, si o adapteaza la intensitatea unui raspuns fiziologic. Apoptoza activa este indusa numai de activarea RCT. Ca rezultat al acestor doua forme de apoptoza, raspunsul feed-back elimina celulele T daca antigenul si IL-2 sunt în exces sau în deficit.

O parte a celulelor T poate sa scape mortii apoptotice pasive sau active si sa devina limfocite T de memorie, cu viata lunga.

Activarea limfocitelor B

Spre deosebire de limfocitele T care recunosc numai antigenul modificat, prelucrat si prezentat în asociatie cu moleculele CMH, limfocitele B recunosc atât forma prelucrata cât si forma nativa, nemodificata a antigenului solubil.

Contactul limfocitelor B cu un antigen timo-dependent, declanseaza diferentierea limfocitelor B pe doua cai:

– calea extrafoliculara, rezultatul fiind sinteza timpurie a

anticorpilor

– calea centrilor germinativi, care duce la memorie imunologica si genereaza plasmocite.

În splina, în absenta cooperarii cu limfocitele Th, consecinta este lipsa de raspuns imun (anergia). Daca are loc cooperarea T-B, se formeaza focare proliferative oligoclonale. Din focare, unele limfocite B migreaza în centrul germinativ si dobândesc memoria imunitara.

Limfocitele B recunosc direct antigenele timo-independente si se activeaza fara sa necesite cooperarea limfocitelor T.

Dupa activare într-un centru germinativ, de catre un antigen T-independent sau dupa interactiuni cu celule Th, celulele B mici în repaus sunt convertite la limfoblaste mari si ulterior acestea evolueaza fie spre plasmocite producatoare de anticorpi, fie se diferentiaza în celule mici de memorie. Procesul de activare în centrul germinativ este însotit de generarea mutatiilor în regiunea V si comutarea de la IgM, la IgG, IgA sau IgE. Mutatiile maresc diversitatea situsurilor de legare a antigenului. Daca mutatia produce un situs nefunctional, celula activeaza programul mortii genetice (apoptoza). Aceste modalitati de diferentiere sunt influentate de semnale co-stimulatoare si de citochine (IL-2, 4, 6, 10, TGFB).

Limfocitul B leaga specific antigenul în configuratia nativa, prin intermediul receptorului imunoglobulinic de membrana si probabil îl încorporeaza sub forma complexului antigen-anticorp. Asa se explica faptul ca anticorpii specifici fata de proteinele native recunosc *epitopi conformationali discontinui*, alcatuiti din aminoacizi, care în secventa primara sunt localizati la distanta, dar în molecula pliata ajung în proximitate. De aceea, limfocitele B sunt foarte eficiente în procesul captarii, prelucrarii si prezentarii unui antigen injectat în doza foarte mica (de 1 000 de ori mai mica decât doza necesara prezentarii aceluiasi antigen de catre macrofage sau de catre celulele dendritice). Antigenele care stimuleaza receptorii celulelor B sunt diverse: proteine, polizaharide, lipide, molecule mici(arsenat, trinitrofenol).

Importanta limfocitelor B ca prezentatoare de antigen este redusa în cursul raspunsului imun primar, dar devin foarte importante în cursul raspunsului imun secundar, în special în cazul în care doza stimulanta de antigen este foarte mica.

În cursul stimularii antigenice secundare, limfocitele B de memorie, a caror populatie este numeroasa, înglobeaza specific antigenul prin intermediul receptorilor imunoglobulinici (endocitoza mediata de receptori sau prin pinocitoza nespecifica).

Soarta antigenului recunoscut specific de limfocitele B nu este cunoscuta. Antigenul ar ramâne în compartimentul vezicular si nu ar fi

amestecat cu proteinele citoplasmatice. Proteinele internalizate, probabil sunt prelucrate de proteazele lizosomale si se elibereaza fragmentele peptidice care se asociaza cu moleculele CMH II. Complexele peptid-molecule CMH II sunt transportate la suprafata celulelor B, unde interactioneaza cu RCT specific al celulelor Th. Interactiunea peptid-RCT, determina eliberarea citochinelor din limfocitul Th, la rândul lor, cu rol stimulator asupra proliferarii si maturarii celulelor B. Pe de alta parte, antigenul nativ, fara sa fie internalizat si prelucrat, ar putea declansa stimularea limfocitelor B de memorie. Din aceasta cauza, raspunsul imun va fi specific fata de epitopii conformationali ai moleculei native, în configuratia sa spatiala.

Limfocitele B recunosc si leaga specific, polipeptide mici si mijlocii. Moleculele proteice mari si antigenele corpusculare sunt înglobate si prelucrate de macrofage si de celulele dendritice, iar epitopii lor sunt expusi în asociatie cu moleculele CMH II, fiind recunoscuti de limfocitele T si B.

Mecanismul molecular al activarii limfocitelor B este greu de studiat, datorita faptului ca proportia limfocitelor stimulate de antigenul specific este mica, chiar si dupa stimularea secundara. Din acest motiv, activarea limfocitelor s-a explicat prin extrapolarea rezultatelor obtinute dupa activarea policlonala nespecifica, *in vitro*, consecutiva legarii moleculelor de lectine, cu efect mitogen asupra limfocitelor B. Receptorii de lectine ai limfocitelor B nu s-au identificat.

A II-a metoda de studiu a mecanismului activarii limfocitelor B a constat în utilizarea anticorpilor cu specificitate fata de Ig de membrana, marcati cu fluorocromi. Astfel s-a evidentiat ca moleculele imunoglobulinice ale suprafetei limfocitului B, cu rol de receptor de antigen, prezinta un grad ridicat de mobilitate. Dupa cuplarea cu anticorpii specifici (sau cu antigenul bivalent specific), moleculele imunoglobulinice membranare se grupeaza în zone discontinui (“petice”) si ulterior conflueaza într-o zona delimitata a membranei, denumita “boneta”. Acesta este fenomenul de “capping” (bonetare). Moleculele receptoare de antigen astfel grupate, sunt eliberate în mediul extracelular sau sunt endocitate. Legarea încrucisata a moleculelor de suprafata, declanseaza activarea limfocitului B.

Receptorul limfocitelor B este evaluat la 10^8-10^9 specificitati de legare. Datorita numarului foarte mare de specificitati de legare antigenica a limfocitelor B, organismul prezinta o mare diversitate de imunoglobuline serice (10000000 tipuri diferite), adica un numar de 1000 de ori mai mare decât numarul proteinelor structurale, enzimatice si hormonale din organism.

Antigenele *timo-independente* par sa activeze limfocitul B, prin acelasi mecanism. Ele au epitopi repetitivi care leaga simultan mai multi receptori de antigen ai membranei limfocitului B. Puntile moleculare între receptorii de antigen, declanseaza semnalul activator al limfocitului, materializat în proliferarea si diferentierea sa.

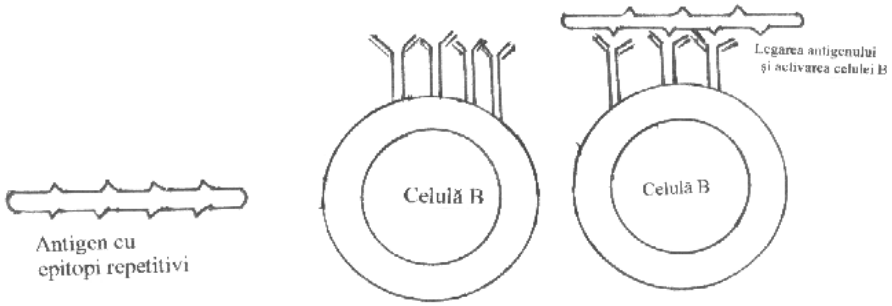


Fig. 68. *Activarea* limfocitului B, dupa legarea unui antigen cu epitopi repetitivi.

Stimularea nespecifica a limfocitelor B

Proliferarea limfocitelor B este indusa nu numai de *antigenul specific* si de *superantigene*, ci de orice ligand care leaga încrucisat receptorii de antigen si formeaza punti intermoleculare. Legarea încrucisata a imunoglobulinelor de suprafata (probabil nu numai a lor, ci si a altor molecule membranare) declanseaza semnalul pentru proliferare, dar nu si pentru diferentierea lor în plasmocite.

Stimularea limfocitului B este, uneori, rezultatul activarii receptorilor membranari neimunoglobulinici, sub actiunea diferitelor *mitogene*. Mitogenele sunt antigene timo-independente. Cele mai cunoscute mitogene sunt *lectinele** din semintele plantelor. Din punct de vedere chimic, mitogenele sunt glicoproteine cu specificitate de legare pentru glucidele de pe suprafata celulelor.

Lectinele sunt produse de toate organismele, dar unele tipuri de celule produc cantitati mari de lectine.

Având o distributie ubicvitara, lectinele îndeplinesc functii biologice importante, fiind molecule de recunoastere în diferite procese biologice:

- eliminarea glicoproteinelor din circulatie
- aderenta agentilor infectiosi de celulele gazda sensibile
- recrutarea leucocitelor la situsul inflamator
- medierea interactiunilor celulelor imunitare.

Lectinele cele mai studiate sunt cele din plantele leguminoase: Con A, PHA, lectinele de soia (SBA) si din arahide (PNA). Ca model de structura, toate lectinele leguminoaselor sunt formate din 2 sau 4 subunitati identice sau aproape identice de 25-30 kD fiecare, toate având aceiasi specificitate de legare a glucidului.

Lectinele se clasifica într-un numar mic de grupe de specificitate, în functie de monozaharidul pentru care ele manifesta cea mai înalta afinitate de legare (manoza, galactoza, N-acetilglucozamina, L-fucoza si acidul N-acetilneuraminic). Unele lectine leaga slab monozaharidul, dar interactioneaza cu oligozaharidele(di-, tri- si tetrazaharidele). De exemplu, selectinele leaga numai oligozaharidele.

Lectinele se combina cu glucidele printr-o retea de legaturi de H si interactiuni hidrofobe.

Lectinele au constituit instrumentul major pentru studiul mecanismelor stimularii mitogenice a limfocitelor.

În prezenta unei lectine mitogene, *in vitro*, o larga varietate de celule tinta neînrudite antigenic, sunt lizate de celulele Tc, fenomen cunoscut sub denumirea de *citotoxicitate dependenta de lectina* (prin analogie cu fenomenul ADCC).

Liza celulelor tumorale de catre macrofage, dependednta de lectine, este o alta forma de citotoxicitate. Unele lectine sunt toxice pentru celulele mamiferelor, *in vivo* si *in vitro*.

Functia majora a lectinelor este cea de recunoastere celulara. De exemplu, hemaglutinina peplosului viral este lectina specifica pentru acidul N-acetil neuraminic, iar lectinele suprafetei bacteriene mediaza legarea celor patogene de celulele gazda, o treapta esentiala pentru initierea procesului infectios. Haptenele inhibitoare ale lectinelor bacteriene protejeaza fata de infectia experimentala cu bacteriile care exprima lectina, furnizând baza dezvoltarii terapiei anti-adezine a infectiilor bacteriene.

Unele lectine ale suprafetei celulei bacteriene mediaza legarea specifica de fagocitele (PMN, macrofage) umane si de soarece, în absenta opsoninelor, rezultatul fiind fagocitoza, ingestia si digestia bacteriilor. Procesul s-a denumit *lectino-fagocitoza*.

La nevertebrate, se crede ca lectinele de pe suprafata hemocitelor sunt molecule de recunoastere a moleculelor nonself.

Lectinele cu functie endocitara sunt receptori legati de membrana cu diferite specificitati si par a avea rol în clearance-ul glicoproteinelor si chiar al celulelor (eritrocite îmbatrânite, bacterii) din circulatie.

Interactiunile adezive mediate de glucidele de suprafata si de

selectine, controleaza traficul leucocitelor spre situsurile inflamatorii si migrarea (homing) a limfocitelor în organele limfoide specifice.

Raspunsul limfocitelor B la lectine este *policlonal*, deoarece sunt activate limfocitele cu specificitati multiple de legare a antigenului. *In vitro*, la concentratii mari, unele mitogene activeaza toate clonele de limfocite B, inclusiv pe cele de memorie, independent de specificitatea lor antigenica. La concentratii mici, mitogenele pot produce chiar activarea specifica a limfocitelor B. Receptorii de mitogene nu se cunosc, dar sunt diferiti de receptorii imunoglobulinici pentru antigene.

Limfocitele T sunt stimulate policlonal de PHA, Con A, iar PWM (pokeweed mitogen) stimuleaza celulele T si B.

Alti activatori policlonali ai limfocitelor B si ai diferentierii lor la plasmocite sunt virusul Epstein-Barr, concentratiile mari de endotoxine ale bacteriilor Gram negative, polizaharidul de *Str. pneumoniae*, ficolul, polimerii D-aminoacizilor, polivinil-pirolidona. Toate aceste antigene persista îndelung în organism, pe suprafata macrofagelor din sinusul subcapsular al ganglionilor limfatici si în zona splenica marginala. Ele leaga încrucisat receptorii imunoglobulinici ai limfocitelor B.

Celulele B ale noilor nascuti nu raspund bine la antigenele timo-independente, ceea ce are consecinte importante pentru eficienta vaccinurilor polizaharidice la copiii mici.

Semnificatia fiziologica a activarii policlonale nu este clara. Dupa activarea nespecifica policlonala, se sintetizeaza anticorpi a caror specificitate nu este totdeauna complementara antigenului inductor. De exemplu, limfocitele B stimulate de virusul Epstein-Barr sintetizeaza anticorpi care se combina cu fosforil-colina, o molecula absenta în structura virionilor, dar prezenta în peretele celular de *Str. pneumoniae*. Activarea policlonala a limfocitelor B este importanta în fazele timpurii ale infectiei, dar are si posibile consecinte negative ce constau în inducerea variatelor fenomene autoimune.

Cooperari celulare în elaborarea raspunsului imun

De cele mai multe ori, sinteza anticorpilor dupa stimularea antigenica, este rezultatul interactiunilor stimulatoare ale limfocitelor B conventionale (B_2), cu limfocitele Th. Un antigen macromolecular poate fi considerat ca un complex format din carrier si determinanti haptenici (epitopi), recunoscuti de limfocitele Th si B.

Antigenele care pentru stimularea raspunsului imun necesita cooperarea celor doua populatii de limfocite, apartin grupului larg al *antigenelor timo-dependente*. Ele sunt reprezentate de proteinele heterologe, de polipeptidele sintetice, de hematiile heterologe, de

flagelina monomera etc. Cele mai multe antigene moleculare, în special de natura proteica sunt timo-dependente.

Cooperari celulare T-B-macrofag. Pentru declansarea raspunsului imun, antigenele timo-dependente necesita cooperarea limfocitelor Th, cooperare supusa restrictiei moleculelor CMH. Aceste antigene se comporta ca univalente, în raport cu specificitatea antigenica a fiecarui determinant si de aceea, în absenta cooperarii celulare, ele sunt ineficiente în stimularea raspunsului imun. Pe de alta parte, antigenele timo-dependente pot fi prea repede degradate de celulele fagocitare. Nu au activitate mitogenica, iar daca se leaga de receptorii limfocitelor B, aceste antigene se comporta ca haptene si nu declanseaza diferentierea celulelor B.

De cele mai multe ori, limfocitele cooperante Th si B recunosc epitopi diferiti ai aceleiasi molecule de antigen solubil nativ, neprelucrat, dar expus pe suprafata limfocitului B. Limfocitele B recunosc epitopi *conformationali* ai antigenelor proteice mici, iar limfocitele Th recunosc epitopi *secventiali*, de 10-20 aminoacizi. Cele doua celule cooperante adera una de alta. Dupa ce recunoaste antigenul, celula Th activata secreta IL-2 în spatiul intercelular îngust, cu rol declansator al stimularii limfocitului B. Clona de limfocite B, cu receptori specifici pentru epitopul antigenic, prolifereaza. Astfel, se produce fenomenul *expansiunii clonale*.

Limfocitele Th si B coopereaza si în cazul în care recunosc epitopi diferiti ai unui antigen, asociati cu moleculele CMH II, pe suprafata unei CPA.

Majoritatea antigenelor solubile si toate antigenele corpusculare sunt captate si prelucrate de macrofage si de celulele dendritice si sunt prezentate în asociatie cu moleculele CMH II. Epitopii acestor antigene, de cele mai multe ori cu specificitate diferita, sunt recunoscuti de limfocitele B si Th. Limfocitele Th se activeaza si elibereaza IL-2 cu efect stimulator asupra limfocitului B, care prolifereaza si se diferentiaza pâna la celula cap de serie – plasmocitul – ce sintetizeaza si secreta anticorpi specifici fata de epitopul stimulator al limfocitului B.

Activarea limfocitelor B, indusa de antigenele timo-independente

Antigenele timo-independente se numesc astfel, deoarece declanseaza raspunsul imun prin activarea directa a limfocitelor B, fara sa necesite cooperarea limfocitelor Th. Antigenele timo-independente sunt molecule mari, neproteice: polizaharidul capsular de *Streptococcus*, ficolul (polimer de sucroza), dextran-sulfatul, LPS ale bacteriilor Gram negative, levanii (polimeri de fructoza),

polivinil-pirolidona.

Antigenele timo-independente au trei proprietati comune:

– au *secvente repetitive* în structura lor chimica. Aceasta conditie nu este suficienta si nici definitorie pentru calitatea de antigen timo-independednt, deoarece polimerii sintetici ai L-aminoacizilor, au secvente repetitive, dar sunt antigene timo-dependente;

– au o *structura tridimensionala* care favorizeaza interactiunea directa cu receptorii de antigen ai limfocitelor B;

– sunt *molecule rezistente* la actiunea enzimelor degradative si persista îndelung în organism.

Limfocitele T nu coopereaza la elaborarea raspunsului imun indus de antigenele polizaharidice, deoarece acestea sunt rezistente la procesele degradative si nu furnizeaza oligozaharide care sa se poata asocia cu moleculele CMH II. Fragmentele moleculare eventual rezultate din procese degradative, se leaga cu afinitate mica de proteine si nu se asociaza cu moleculele CMH II.

Cele doua categorii functionale de antigene nu sunt strict delimitate în ceea ce priveste mecanismul activarii raspunsului imun. Dupa degradarea structurilor repetitive, antigenele timo-independente devin timo-dependente. De exemplu, glucagonul(antigen timo-dependent), dupa clivare cu tripsina, elibereaza doi determinanti antigenici: unul corespunzator capatului N-terminal, timo-independent si cel corespunzator capatului C-terminal, timo-dependent(stimulator al limfocitelor Th).

Activarea limfocitelor B_1

Limfocitele B_1 par sa fie stimulate si sa produca anticorpi dupa un mecanism independent de celulele T. Aceste celule au nivele înalte de IgM pe suprafata lor, apar timpuriu în ontogenie si migreaza predominant în *cavitatile peritoneala si pleurala*, au capacitate de reînoire si manifesta diferite specificitati de legare a epitopilor antigenici. Celulele B_1 recunosc antigenele bacteriene comune (fosforil-colina), Ig, ADN, proteinele membranare eritrocitare.

Spectrul reactivitatii nu este limitat la molecule nonself, ci se manifesta si fata de molecule proprii: hormoni (insulina, tiroglobulina), constituienti celulari (ADN, miozina, tubulina, fosfolipide, fragmentul Fc al IgG autolog). Sinteza auto-anticorpilor de catre celulele B_1 este argumentata de faptul ca expansiunea neoplazica a acestor celule (ca în leucemia limfocitara cronica) este adeseori asociata cu simptomele autoimune.

Celulele B_1 au un rol important în imunitatea înascuta, deoarece secreta cantitati mari de anticorpi naturali (IgM) fara expunerea la antigenele din mediu si fara imunizare.

Celulele B_1 au o contributie foarte importanta la raspunsul imun al mucoaselor. Multe plasmocite din structurile limfoide ale intestinului, producatoare de IgA, deriva din celulele peritoneale B_1, sugerând migrarea limfocitelor între cavitatea peritoneala si GALT. IgA sintetizat fata de antigenele peretelui bacteriilor din lumenul intestinal, este secretat în special de celulele B_1. sIgA produs de celulele B_1 are rol important în protectia suprafetei mucoaselor, împiedicând penetrarea sistemica a bacteriilor microbiotei intestinale. Sinteza sIgA nu necesita celulele Th si nici structuri foliculare organizate (placi Peyer si centri germinali).

Un alt situs strategic de aparare antimicrobiana este *zona marginala a splinei*, localizata la jonctiunea pulpei albe si rosii. Ea contine macrofage, celule dendritice, celule B si este prima linie de aparare fata de agentii patogeni veniti pe cale sanguina. Celulele B din zona marginala se deosebesc fenotipic de alte limfocite splenice prin prezenta mai bine exprimata, a receptorilor pentru complement si pentru IgM. Ca si celulele B_1 peritoneale, celulele zonei marginale sunt foarte sensibile la stimularea cu LPS, care induce diferentierea lor rapida în plasmocite. Stimularea lor este independenta de celulele Th.

Efectele stimularii antigenice asupra tesutului limfoid secundar

Antigenul injectat intravenos este captat preferential de macrofagele din zona marginala a splinei. Antigenele care strabat mucoasa intestinala sunt captate de celulele M ale domului placii Peyer. Ele sunt transportate la limfocitele T si B din ariile placii. Evenimente asemanatoare au loc în tesutul limfoid asociat bronhiilor.

Antigenul injectat subcutan sau intradermic este transportat în ganglionii limfatici locali, fie în stare libera cu fluxul limfatic, fie legat pe suprafata celulelor specializate(celulele Langerhans parasesc epiderma prin vasele limfatice eferente, devin celule cu voal si dupa ce ajung în ganglionul limfatic migreaza în aria celulelor T si devin celule interdigitate).

Limfocitele mature recirculante vin în contact cu CPA, se activeaza si formeaza *centrii germinativi.*

Într-un ganglion limfatic se disting 4 faze ale reactivitatii celulare.

1) In primele ore dupa stimularea antigenica se produce o reactie inflamatorie locala, cu o crestere a fluxului sanguin de circa 25 de ori.

Se intensifica traficul limfocitar spre ganglionii regionali. Concomitent se produce obturarea caii de iesire a limfocitelor din ganglion, dar rata curgerii limfei nu se modifica. Sub actiunea unor factori locali (prostaglandine, factori de aderenta) se mareste gradul de aderenta limfocitelor si astfel în ganglioni se formeaza un “dop” limfocitar.

2) Dupa 1-2 zile se intensifica iesirea limfocitelor ganglionare în fluxul limfatic eferent. In ganglion sunt retinute limfocitele care au recunoscut specific antigenul.

3) În cea de a III-a si a IV-a zi dupa stimularea antigenica se intensifica proliferarea limfocitelor activate si în limfa eferenta apar limfoblaste. Acestea au proprietati specifice de homing: vor migra în alti ganglioni si în noile sedii se diferentiaza în celule care sintetizeaza anticorpi (plasmocite).

4) Dupa cea de a IV-a zi diminua generarea blastelor. Din celulele stimulate rezulta celule de memorie care trec în sânge si devin circulante.

Stimularea cu antigene timo-dependente este însotita de formarea *centrilor germinativi*. In centrii germinativi, limfocitele B proliferante se gasesc în asociatie cu limfocitele Th.

Dinamica raspunsului imun mediat humoral

În serul normal, cantitatea totala de imunoglobuline este de 10 mg/ml (circa 5 x 10^{16} molecule).

Înainte de imunizare, anticorpii serici specifici fata de un antigen dat, sunt sub nivelul detectabil prin metodele clasice.

Raspusul imun generat dupa contactul primar al organismului cu antigenul constituie raspunsul imun primar, în a carui dinamica se disting trei faze:

- faza de latenta
- faza de crestere a titrului anticorpilor
- faza de scadere a titrului anticorpilor serici.

Faza de latenta este intervalul cuprins între momentul stimularii antigenice si începutul cresterii titrului anticorpilor serici. Durata sa este foarte variabila în functie de *natura antigenului* (de exemplu, 2-3 zile pentru hematiile de berbec si 20 de zile pentru toxina difterica), *de doza* de antigen administrata, de *calea* de administrare (subcutana, intramusculara, intravenoasa), de *modul* de administrare (cu sau fara adjuvant).

Latenta este mai scurta pentru antigenele corpusculare. Perioada de latenta este necesara expansiunii clonale. La contactul primar al sistemului imunitar cu antigenul, în organism se gaseste o populatie numeric restrânsa de limfocite care recunosc specific antigenul. In perioada de latenta, clona de limfocite activata specific, prolifereaza intens (cu o succesiune de circa 8 generatii celulare) si va produce o populatie de celule, corespunzatoare numeric reactiei de aparare a organismului.

Faza de crestere a titrului anticorpilor serici începe la sfârsitul perioadei de latenta. Titrul anticorpilor creste cu o rata exponentiala. Durata sa este foarte variabila: fata de hematiile de berbec, titrul maxim al anticorpilor este atins la 4-5 zile, iar al anticorpilor anti-toxina difterica, la circa 90 de zile. Titrul ramâne maxim (în platou), câteva zile, dupa care începe sa scada.

Faza de scadere a titrului anticorpilor începe curând dupa atingerea valorii maxime. Rata scaderii depinde de rata sintezei, de rata degradarii anticorpilor, dar si de cantitatea de antigen disponibil, care leaga anticorpii în complexe, determinând scaderea titrului lor. Titrul IgG scade cu 7%/ zi, IgA – cu 25%/ zi, IgM – cu 18%/zi. La 30-40 de zile, titrul anticorpilor poate deveni nedectabil. În fazele de crestere si de scadere a titrului, anticorpii sunt detectabili prin reactii secundare *in vitro*, de aglutinare si de precipitare.

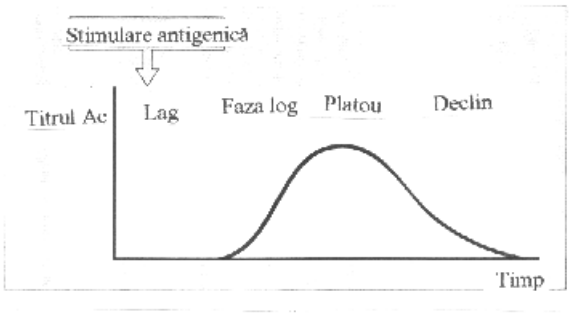


Fig. 69. Cele 4 *faze* caracteristice ale raspunsului: faza de *lag*, faza *cresterii logaritmice* a *titrului anticorpilor, faza de platou si faza de declin*, în timpul careia anticorpii sunt catabolizati. Dinamica raspunsului imun depinde de natura antigenului si de specia gazda.

În perioada de debut a raspunsului imun primar se sintetizeaza IgM. Dupa câteva zile se detecteaza IgG, care atinge un titru maxim mai înalt decât IgM. Titrul IgM începe sa scada, înainte ca titrul IgG sa atinga valoarea maxima. La nivelul maxim al titrului anticorpilor, IgG este de circa 10 ori mai concentrat decât IgM, ceea ce denota ca dupa

activare, desi majoritatea limfocitelor B (circa 90%) au ca receptor de antigen molecula de IgM, dupa activare *comuta* sinteza de la izotipul IgM la izotipul IgG.

Unele limfocite ale clonelor în expansiune, nu se diferentiaza în plasmocite, ci sintetizeaza molecule de imunoglobulina care ramân asociate membranei citoplasmatice. În tehnica hemolizei localizate în gel, aceste celule nu produc plaje de liza. Ele constituie substratul celular al *memoriei imunitare*.

Raspunsul imun are caracter adaptativ si se caracterizeaza prin trei trasaturi esentiale (care lipsesc reactiilor de aparare nespecifice, înascute):

– *specificitatea* (anticorpii se combina cu antigenul inductor)

– *diversitatea izotipica* si a situsului de combinare

– *memoria* (pastrarea memoriei experientei contactului cu antigenul).

Diversitatea. Moleculele de anticorpi sunt foarte heterogene în ceea ce priveste izotipul (IgG, A, M, E). IgM dispare relativ repede, dar IgG si IgA persista la titruri scazute, nedectabile prin metodele obisnuite, pentru perioade variabile (saptamâni, ani). Anticorpii sunt heterogeni din punctul de vedere al specificitatii de legare cu diferiti epitopi ai antigenului inductor.

Anticorpii raspunsului imun primar (IgM si IgG), în general, au *afinitate* scazuta, dar *aviditatea* lor este mare.

Afinitatea anticorpilor masoara forta de legare dintre un epitop si situsul de combinare al anticorpului specific. Afinitatea este rezultanta fortelor de atractie (legaturi de H, forte electrostatice, forte van der Waals, legaturi hidrofobe), dintre cele doua grupari reactante.

Aviditatea masoara forta rezultanta a afinitatii dintre epitopii multipli si paratopii complementari si este consecinta faptului ca cele mai multe antigene sunt mozaicuri de epitopi. Complexele antigen-anticorp cu IgM au aviditate mare, deoarece anticorpul este decavalent.

RASPUNSUL IMUN HUMORAL SECUNDAR

Raspunsul imun secundar este expresia *memoriei imunitare*. Memoria defineste capacitatea unui organism de a elabora un raspuns imun mai eficient, adica mai rapid, dar în special mai intens, dupa contactul secundar cu antigenul.

Raspunsul imun secundar fata de antigenele *timo-independente* este comparabil cu raspunsul imun primar:

– dupa stimularea secundara, titrul anticorpilor nu creste semnificativ

– se sintetizeaza predominant IgM

– nu se produce comutarea sintezei la IgG

– memoria imunitara este slab exprimata.

Raspunsul imun secundar este indus de antigenele *timo-dependente* si se caracterizeaza printr-o latenta mai scurta, cresterea rapida a titrului anticorpilor, cu un maxim mult mai înalt decât în raspunsul imun primar.

Doza de antigen inductoare a raspunsului imun secundar este mult mai mica, iar timpul necesar dublarii titrului este de ordinul orelor. Initial se sintetizeaza IgM, fara o perioada evidenta de latenta. Sinteza IgG este de asemenea accelerata. Titrul maxim al IgG este de câteva ori mai mare decât în raspunsul imun primar si ramâne ridicat o perioada mult mai lunga de timp.

Din punctul de vedere al evenimentelor celulare, la câteva zile dupa initierea raspunsului imun secundar, limfocitele B de memorie, activate, migreaza în maduva osoasa si se matureaza în plasmocite. *Maduva osoasa* este un sediu major al raspunsului imun specific si o sursa majora de imunoglobuline. In raspunsul imun secundar, cea mai mare parte a imunoglobulinelor se sintetizeaza în maduva osoasa. In timp ce tesutul limfoid periferic raspunde rapid dupa stimularea antigenica, dar numai pentru o perioada scurta, maduva osoasa raspunde lent, dar sinteza de anticorpi este masiva si de lunga durata, fata de un antigen care stimuleaza repetat.

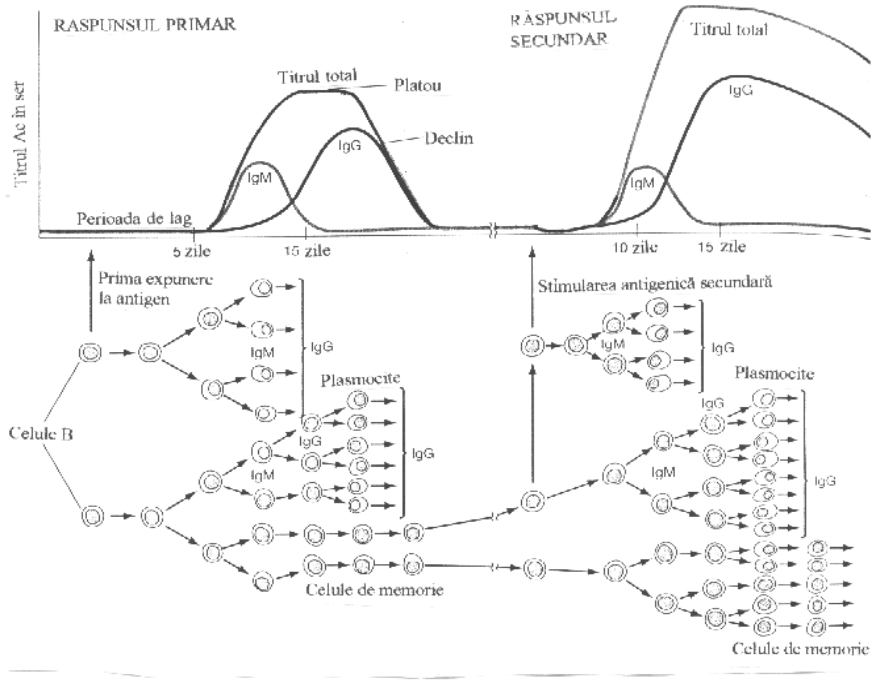


Fig. 70. Raspunsul imun primar si secundar fata de un antigen macromolecular. Este ilustrata corelarea titrului anticorpilor cu activitatea celulelor B. Citochinele regleaza comutarea sintezei de la IgM la IgG.

Trasaturile distinctive ale raspunsului imun secundar sunt:

a) *maturarea afinitatii anticorpilor;*

b) *comutarea izotipului la sinteza IgG*.

Maturarea afinitatii anticorpilor se explica prin aceea ca pe parcursul diferentierii proliferative a limfocitelor B, se produc *mutatii somatice* ale secventei regiunii V, prin substitutii de nucleotide si prin selectia mediata de antigen, a clonelor de limfocite cu afinitate mare de legare a epitopilor complementari. La om, hipermutatia are loc în prezenta antigenului, în *centrii germinativi*, singurul situs în care antigenul este retinut pentru luni sau ani, asociat cu celulele. Antigenul este sechestrat pe suprafata celulelor dendritice foliculare, care îl pastreaza sub forma complexelor antigen-anticorp, în proximitatea limfocitelor B. Consecutiv mutatiei somatice, se sintetizeaza anticorpi cu afinitate mai mare, deoarece, treptat, creste numarul limfocitelor B cu mutatii care confera afinitate mai mare de legare a anticorpilor cu antigenul. Celulele B care au suferit mutatii nefunctionale, mor prin

apoptoza.

Mutatiile sunt mai ales *punctiforme*, cu foarte rare deletii sau insertii a nucleotidelor unice.

Sinteza anticorpilor cu afinitate înalta are doua consecinte practice importante:

– complexele antigen-anticorp sunt greu disociabile si se elimina mai rapid din mediul intern;

– anticorpii dau reactii încrucisate cu antigenele înrudite.

Reactiile încrucisate ale anticorpilor cu afinitate crescuta au o importanta practica deosebita, pentru ca imunizarile cu antigene înrudite, pot avea efecte neasteptate. De exemplu, indivizii adulti vaccinati cu virusul influenza, pot sa produca, surprinzator, anticorpi cu un titru mai mic fata de antigenul folosit în vaccinare, decât titrul anticorpilor fata de o tulpina de virus care a produs o infectie la vârsta copilariei. Acesta este fenomenul "amintirii pacatului originar" si sta la baza studiilor epidemiologice retrospective, pentru precizarea serotipului unui agent infectios care a declansat epidemii trecute. Explicatia consta în faptul ca imunizarea primara genereaza celule cu memorie fata de mai multe antigene înrudite. La reîntâlnirea cu unul din antigenele înrudite, este stimulata o populatie de celule care recunoaste determinanti antigenici comuni. Se sintetizeaza anticorpi care se combina cu ambele variante antigenice, desi, uneori, anticorpii specifici fata de epitopii celui de al II-lea antigen pot sa lipseasca.

Comutarea izotipului consta în trecerea de la sinteza IgM în cursul raspunsului imun primar, la sinteza altor izotipuri, în special IgG, în raspunsul imun secundar.

La nivel molecular, comutarea izotipului este rezultatul deplasarii complexului genic VDJ, de la pozitia sa originala, adiacenta capatului 5' al genei Cμ, într-o pozitie noua, adiacenta capatului 5' al altei gene C, de exemplu C γ. Dupa aceasta aranjare genica, toata secventa genica dintre pozitia initiala a complexului VDJ si localizarea finala, este eliminata prin deletie. Procesul rearanjarii genelor se numeste *recombinare prin comutare* (switch recombination).

Exceptia de la acest mecanism este sinteza simultana a receptorilor de membrana IgM si IgD (mIgM si mIgD), de catre celulele B mature. Sinteza catenei δ nu implica recombinarea prin comutare, ci este rezultatul înadirii alternative a exonilor unei copii de ARN premesager care contine genele VDJ, cu secventa genei Cμ sau a genei Cd.

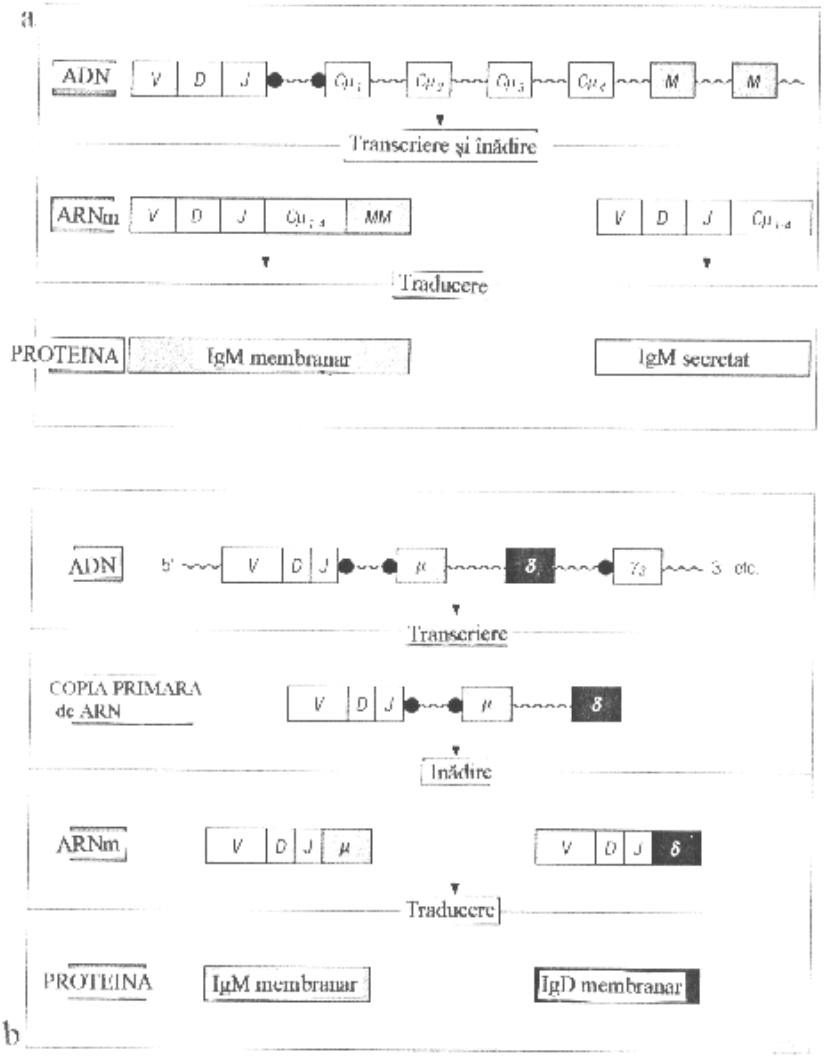


Fig. 71. **a**. Mecanismul *înadirii genice* pentru comutarea de la IgM membranar, la IgM secretat. Pentru forma secretata, secventa hidrofoba codificata de exonii M-M care ancoreaza IgM receptor de membrana este eliminata. **b**. IgM si IgD cu functia de receptori de antigen, coexista pe aceiasi celula, prin înadirea diferentiata a copiei primare de ARN.

Gena activa pentru sinteza imunoglobulinelor este transcrisa în ARN premesager, care contine secvente codificatoare pentru regiunile V si C (exoni), dar si secvente necodificatoare(introni). Intronii se gasesc

între secventele recombinate VJ sau VDJ si gena C. Pentru catena H, intronii se gasesc între exonii care codifica domeniile individuale. Intronii sunt eliminati prin înadirea ARN si rezulta ARNm unitar, care este tradus în polipeptidele moleculei de imunoglobulina.

Sinteza imunoglobulinei se face cu rate distincte în diferite celule B, în raport cu gradul ei de diferentiere. O celula B nestimulata antigenic sintetizeaza circa 10^6 molecule de imunoglobulina pe zi, cu rol, în primul rând, de receptori membranari de antigen, iar un plasmocit produce pâna la 2000 molecule de imunoglobulina/secunda, toate având rolul de anticorpi plasmatici.

Nevertebratele nu au memorie imunitara.

Anticorpii îndeplinesc urmatoarele functii esentiale:

– se combina specific cu antigenele solubile si formeaza complexe antigen-anticorp, care sunt epurate de macrofage

– neutralizeaza toxinele

– se leaga specific cu determinantii antigenici virali si neutralizeaza infectiozitatea virionilor

– opsonizeaza microorganismele dintr-un focar infectios

– fixeaza complementul pe suprafata unui antigen celular si efectul este liza (bacterioliza, citoliza, hemoliza).

Factorii care conditioneaza intensitatea raspunsului imun

Titrul anticorpilor sintetizati în cursul raspunsului imun este dependent de mai multi factori: de *calea* de administrare a antigenului, de *doza*, de *ritmul* si *modul* de administrare (cu sau fara adjuvant) si *de factorii genetici* ai organismului imunizat.

Pentru producerea contactului rapid dintre antigen si celulele imunocompetente din ganglionii limfatici este avantajoasa calea parenterala de administrare: *intradermica, subcutana* sau *intramusculara.* Injectarea intravenoasa favorizeaza contactul antigenului cu limfocitele din splina, dar raspunsul imun are o intensitate mica, datorita eliminarii rapide a antigenului.

Cea mai eficienta cale de administrare a antigenului este cea *intradermica*, pentru ca persistenta sa la locul injectarii este de lunga durata si la situsul injectarii se acumuleaza celule implicate în elaborarea raspunsului imun. Exista chiar posibilitatea sintezei locale, *in situ*, a anticorpilor.

Doza de antigen influenteaza nivelul afinitatii anticorpilor. Dozele mari de antigen, induc o maturare insuficienta a afinitatii anticorpilor, în raport cu dozele mici, deoarece acestea stimuleaza numai clonele de

limfocite cu receptori de înalta afinitate fata de antigenul stimulant, în timp ce dozele mari ale aceluiasi antigen stimuleaza clonele de limfocite de înalta si de mica afinitate si produc chiar stimularea nespecifica a limfocitelor.

Intensitatea raspunsului imun este dependenta de *legea dozelor repetate si a intervalelor*. Administrarea aceleiasi doze de antigen, în mod fractionat si la intervale adecvate, este mai eficienta decât administrarea dozei unice, deoarece fiecare doza mica pregateste organismul, facându-l mai reactiv fata de doza urmatoare.

Uneori, a II-a injectare, foarte apropiata în timp de prima, poate fi inoperanta, deoarece antigenul este eliminat de anticorpii sintetizati dupa stimularea primara. Cel mai bun protocol de administrare pentru a obtine un raspuns imun secundar optim, consta în injectarea unei doze mici de antigen, urmata de doze progresiv crescânde.

O cantitate prea mare de antigen, produce “inundarea” organismului cu substante nonself si raspunsul este paradoxal. In loc de stimularea raspunsului imun se obtine efectul invers, denumit *paralizie imunologica*.

Paralizia imunologica este o reactie de protectie a organismului, fata de dozele mari de antigen. Organismul îsi blocheaza toate mecanismele de raspuns imun. Fenomenul areactivitatii imunitare poate surveni atât dupa injectarea unei cantitati prea mari de antigen usor metabolizabil, cât si dupa injectarea unei cantitati moderate a unui antigen care se metabolizeaza greu. La fiecare specie de organisme, pentru fiecare antigen, pare sa existe un echilibru controlat genetic, între doza stimulatoare a raspunsului imun si cea care produce paralizia imunologica.

Antigenele “bune” sunt hidrolizate partial si stimuleaza declansarea raspunsului imun, iar antigenele “slabe”, fie sunt degradate rapid, fie sunt rezistente la degradare si induc starea de paralizie imunitara. De aceea, doza optima necesara inducerii unui raspuns imun optim este diferita de la un antigen la altul si se determina experimental pentru fiecare caz. De asemenea, pentru fiecare antigen se stabileste numarul de fractii ale dozei, intervalul administrarii fractiilor, calea de administrare, adjuvantul.

Pentru antigenele corpusculare, injectarile se fac, în general, la 7 zile, iar pentru cele macromoleculare, la 14-21 de zile.

Raportul dintre cantitatea de antigen intact si cel partial degradat, care se gaseste în organism la un moment dat dupa adminisrare, este o reflectare directa a ratei cu care antigenul este metabolizat.

Imunogenitatea unui antigen este influentata de *modul de*

administrare. Asocierea cu adjuvantii mareste gradul de imunogenitate a multor antigene, iar pentru altele, asocierea cu un adjuvant este o conditie obligatorie a imunogenitatii. Administrarea în asociere cu un adjuvant este foarte importanta pentru imunogenitatea proteinelor usor degradabile si a celor slab imunogene (de exemplu, hormonii). Cele usor degradabile, dupa administrare în stare nativa, dispar repede din organism, dar în asociatie cu un adjuvant sunt eliberate treptat, stimulând organismul o perioada mai lunga de timp.

Injectarea intravenoasa anuleaza efectul favorabil al adjuvantului.

Maturitatea sistemului imunitarn (imunocompetenta) influenteaza intensitatea raspunsului imun. Administrarea unui antigen la un organism al carui sistem imunitar este imatur, nu activeaza raspunsul imun, ci induce o *stare de toleranta.*

Raspunsul imun al indivizilor umani, la cei doi poli ai vârstelor, este slab. La copii, sistemul imunitar este imatur, iar la vârstnici, treptat, functia imunitara diminua, ceea ce se reflecta în reducerea activitatii limfocitelor T, cresterea proportiei limfocitelor Ts, scaderea activitatii celulelor NK, toate având un efect imunodepresiv, asociat cu cresterea incidentei neoplaziilor si cu scaderea capacitatii de aparare fata de agentii infectiosi.

Factorii genetici sunt esentiali pentru capacitatea de raspuns imun a organismului. O substanta nonself poate fi un bun antigen pentru unele specii, dar neantigenica pentru altele. De exemplu, albumina serica bovina este imunogena pentru iepure, dar este slab imunogena pentru om, iar polizaharidul capsular de *Str. pneumoniae* este imunogen pentru om si soarece, dar neimunogen pentru iepure si cobai.

Antigenele naturale sunt mozaicuri de epitopi. Sistemul imunitar al unei specii, recunoaste unii epitopi, dar raspunde mai greu sau ignora alti epitopi. Diferitele specii de organisme, pot sintetiza anticorpi cu specificitati distincte fata de acelasi antigen, deoarece recunosc epitopi diferiti.

Uneori se înregistreaza diferente semnificative ale reactivitatii imunitare, chiar între organisme ale aceleiasi specii, corelate cu starea fiziologica, cu starea nutritiva, cu sexul, cu vârsta. Din aceasta cauza, serurile imune nu sunt reactivi standardizati si rezultatele obtinute în reactiile imune *in vitro*, nu sunt totdeauna reproductibile.

Anticorpi naturali

Imunoglobulinele serice sunt cele mai abundente proteine serice (10 mg/ml), care s-au sintetizat în afara oricarui proces de imunizare, dar au specificitate fata de antigene cunoscute. De exemplu, în serul de soarece se gasesc anticorpi anti-hematie de berbec. Denumirea de anticorpi “naturali” sau “spontani” s-a folosit pentru a-i distinge de anticorpii sintetizati dupa imunizare. Anticorpii naturali se sintetizeaza ca urmare a stimularii imunitare continue, sub actiunea antigenelor microbiotei intestinale. Functiile anticorpilor naturali sunt controversate.

Anticorpii naturali sunt *polireactivi*, adica dau numeroase reactii încrucisate, cu o diversitate de antigene (polizaharide, proteine, acizi nucleici), de diferite origini: virale, bacteriene, fungice sau ale parazitilor multicelulari.

O importanta deosebita au anticorpii naturali ce se leaga cu determinantul α-gal, cu levanul, cu LPS sau cu fosfatidil-colina. Functia anticorpilor naturali anti-α-gal pare a fi legata direct de apararea fata de agentii patogeni. Pierderea genei galactozil-transferaza în evolutie, a conferit un avantaj, prin sinteza anticorpilor anti-gal, cu rol protector fata de agentii patogeni.

Majoritatea anticorpilor naturali sunt sintetizati de un set special de limfocite B, denumite B_1.

Sinteza anticorpilor naturali se datoreaza faptului ca, postnatal, organismele sunt supuse stimularilor antigenice multiple, cu antigene de diferite origini (virale, bacteriene, fungice, alimentare), care patrund pe calea mucoaselor digestive si respiratorii. Antigenele stimuleaza policlonal, limfocitele B din formatiunile limfoide asociate mucoaselor. Desi se sintetizeaza dupa stimulari repetate cu doze mici de antigene, afinitatea anticorpilor naturali este inferioara celei a anticorpilor sintetizati dupa imunizare.

Anticorpii naturali apartin izotipului IgM. Din aceiasi categorie fac parte *aglutininele sanguine* α *si* β. Sinteza lor are loc înainte de nastere, în afara oricarei stimulari antigenice.

Anticorpii naturali, datorita spectrului larg de legare cu antigene majore comune diferitilor agenti patogeni, au rolul de *molecule de recunoastere ale imunitatii înascute*.

Sistemul imunitar înascut cuprinde si molecule cu o structura diferita de aceea a anticorpilor, ca *lectina care leaga manoza* (MBL = *m*anose *b*inding *l*ectin). Este o opsonina din sânge care fixeaza complementul si utilizeaza receptorul C1q al macrofagului.

Serul normal de bovine contine o proteina denumita *conglutinina*, care determina agregarea (conglutinarea) eritrocitelor tapetate cu componente ale complementului. La alte specii, sinteza conglutininei este indusa de imunizarea cu molecule tapetate cu componente ale complementului sau sinteza sa este declansata dupa activarea complementului *in vivo*.

Imunoconglutininele sunt auto-anticorpi fata de epitopi exprimati de componentele activate ale complementului, care în moleculele native sunt criptice. Conglutininele sunt anticorpi anti-complement, echivalenti factorilor reumatoizi, specifici fata de IgG. Serul uman contine nivele scazute de imunoconglutinine, dar nivelul lor creste dupa activarea complementului în infectiile acute si cronice si în maladiile inflamatorii cronice, produse de virusuri, de microorganisme si de paraziti.

Biosinteza imunoglobulinelor

Sediul sintezei imunoglobulinelor este *plasmocitul*. Limfocitele sintetizeaza cantitati minime de imunoglobuline, care ramân ancorate în membrana citoplasmatica si au rolul de receptor de antigen. Dupa activarea limfocitului, celulele descendente rezultate printr-un proces de proliferare si diferentiere, sintetizeaza cantitati crescânde de imunoglobuline.

Plasmocitul este celula cap de serie, diferentiata terminal, care nu se divide si traieste câteva zile. Ea sintetizeaza molecule identice de imunoglobuline (monoclonale), cu o singura specificitate de legare fata de un epitop antigenic, cu o rata de circa 2000 molecule/secunda.

Catenele polipeptidice L si H se sintetizeaza separat, pe polisomi de dimensiuni diferite, atasati pe cisternele reticulului endoplasmic. Marimea polisomilor este proportionala cu lungimea catenei polipeptidice, pe care o sintetizeaza si este dependenta de lungimea moleculei de ARNm codificatoare. Catena L se sintetizeaza pe polisomi de 7-8 ribosomi, iar catena H, pe polisomi de 14-16 ribosomi. Polisomii lungi, purificati precipita *in vitro*, cu serul imun anti H.

Cele doua catene se sintetizeaza ca precursori mai mari, cu o secventa N-terminala de circa 20 de aminoacizi (secventa leader), care este clivata în timpul transferului în lumenul cisternei de reticul

endoplasmic. Cele doua tipuri de catene se sintetizeaza ca unitati de sine statatoare si ulterior se asambleaza pentru a forma o structura tetracatenara. Moleculele de imunoglobulina sintetizate, se acumuleaza în cisternele reticulului endoplasmic granular si ulterior sunt transferate în cisternele Golgi. La acest nivel se formeaza legaturile S-S si se ataseaza gruparile glucidice. Compozitia componentei glucidice este variabila, dar ca structura de baza este reprezentata de N-acetil-glucozamina, manoza, galactoza, fucoza, acid sialic. Legarea primelor doua monozaharide începe în momentul în care catena H este atasata de polisom. Catena polizaharidica se alungeste progresiv, pe masura ce proteina se deplaseaza în cisternele Golgi. Moleculele de anticorpi parasesc aparatul Golgi, în vezicule secretorii, care fuzioneaza cu membrana citoplasmatica si elibereaza continutul la exterior.

Glicozilarea este o conditie obligatorie pentru secretia moleculelor de imunoglobulina.

Moleculele de IgA si IgM prezinta forme polimerizate. Asocierea polimerilor este catalizata de lantul J. Polimerizarea are loc concomitent cu secretia. In citoplasma plasmocitului nu se gasesc molecule polimerizate.

În celulele care sintetizeaza imunoglobuline destinate secretiei, catenele L se gasesc în mic exces fata de catenele H. Pentru fiecare din cele doua tipuri de catene, exista un numar egal de molecule de ARN, dar catena L se sintetizeaza de doua ori mai repede decât catena H, având dimensiuni de doua ori mai mici.

Catabolismul imunoglobulinelor

Catabolismul imunoglobulinelor s-a studiat utilizând moleculele marcate cu I^{125} sau I^{131}. Primul are timpul de înjumatatire de 57 de zile, iar al II-lea, de 8 zile. Iodul radioactiv se cupleaza cu nucleul aromatic al tirozinei, sub actiunea blânda a unor agenti oxidanti (H_2O_2, cloramina T), care maresc sansa ca molecula de imunoglobulina marcata sa ramâna nemodificata din punct de vedere structural si functional. Rata scaderii radioactivitatii, reflecta rata catabolizarii proteinei native. Catabolizarea imunoglobulinei este o reactie de ordinul 1, adica din molecula nativa rezulta produsi finali de catabolism.

Cantitatea de imunoglobulina catabolizata(dIg) într-un interval de timp (dt) este direct proportionala cu concentratia moleculelor în sânge si este constanta, conform relatiei: d Ig/dt = k Ig (k reprezinta rata catabolizarii imunoglobulinelor, adica fractia de molecule din cantitatea totala, ce se catabolizeaza în unitatea de timp, de obicei în 24 de ore).

Rata de catabolizare este o reflectare directa a timpului de

înjumatatire a imunoglobulinelor. Valorile celor doi parametri sunt cu atât mai mari, cu cât concentratia imunoglobulinelor este mai mare. Pentru calculul ratei de catabolizare a imunoglobulinelor este suficient sa se determine timpul de înjumatatire a radioactivitatii, care la un individ normal este de 22 de zile.

Mecanismul catabolizarii imunoglobulinelor. Prima ipoteza cu privire la mecanismul molecular al catabolizarii afirma ca moleculele de imunoglobulina trec din spatiul vascular, într-un "compartiment de catabolizare", în care se gasesc celule capabile sa le recunoasca si sa le capteze prin pinocitoza. Deoarece aceste celule au un numar limitat de receptori capabili sa lege specific moleculele de imunoglobulina, în veziculele de micropinocitoza vor fi încorporate nu numai moleculele fixate pe receptori, ci si molecule libere. In acceptiunea ipotezei, *moleculele fixate pe receptorii celulelor, sunt protejate de procesele degradative* si parasesc celula, revenind în circulatie, în timp ce moleculele care au fost pinocitate nespecific (fara legarea prealabila de receptori) sunt degradate. Ipoteza explica logic dependenta ratei de catabolizare a imunoglobulinelor, de concentratia lor. La concentratie sanguina scazuta, majoritatea moleculelor de imunoglobuline sunt endocitate specific, prin intermediul receptorilor si astfel sunt protejate de degradare, întorcându-se intacte în circulatie. Asa se explica faptul ca în cazurile de hipogamaglobulinemie, timpul de înjumatatire este mare. La concentratii mari de imunoglobuline, timpul de înjumatatire se scurteaza. În aceste cazuri, numai o proportie mica de molecule este protejata de degradare prin legarea de receptorii celulari, restul fiind endocitate nespecific si expuse degradarii.

A II-a ipoteza considera ca procesul catabolic este initiat numai *dupa ce moleculele de imunoglobuline au suferit o modificare conformationala a regiunii Fc*. Moleculele modificate (prin uzura metabolica) se fixeaza prin regiunea Fc, de membrana celulelor care au astfel de receptori: leucocitele, PMN, macrofagele (în special hepatice si splenice) si sunt înglobate prin micropinocitoza. In veziculele de pinocitoza, are loc reducerea legaturilor S-S intercatenare si hidroliza sub actiunea enzimelor lizosomale. Aceasta ipoteza, contrara celei de mai sus, considera ca moleculele de imunoglobulina, odata fixate pe receptorii celulari, sunt înglobate în celule si degradate partial sau total. Pentru procesul catabolizarii, în conceptia ipotezei, hotarâtoare este tranzitia moleculei de imunoglobulina de la conformatia nativa, la cea modificata. Ipoteza este sprijinita de heterogenitatea receptorilor pentru Fc de pe suprafata macrofagelor. O categorie de receptori pentru Fc fixeaza numai moleculele care au suferit modificari ale regiunii Fc. Ei se

deosebesc de receptorii clasici pentru Fc, care leaga moleculele native de imunoglobulina.

Utilizari ale serurilor imune

Cea mai larga utilizare (în perioada 1920-'40) a serurilor imune a constituit-o domeniul *seroterapiei* (terapia de urgenta a unor infectii septicemice, a infectiei difterice, scarlatinoase, tetanice, rabice). Dezavantajul major este ca serurile imune contin nu numai anticorpii specifici, ci si toate celelalte proteine serice, care sunt imunogene pentru organismul receptor si induc raspunsul imun, adeseori cu manifestari patologice (boala serului).

Anticorpii se folosesc în tehnici si metodologii de *diagnostic imunologic*. Utilizarea lor depinde de posibilitatea de a-i produce pe iepure, capra, berbec sau cal. Principalele directii de utilizare a anticorpilor sunt urmatoarele:

– în determinarile fine ale unor cantitati mici de antigene (tehnicile ELISA, RIA);

– pentru purificarea proteinelor în cromatografia de afinitate;

– pentru identificarea unor medicamente în ser si urina;

– pentru detoxifierea organismului de droguri (eliminarea digoxinei dupa intoxicare prin administrarea îndelungata la pacientii cu insuficienta cardiaca);

– pentru identificarea unui agent infectios, prin reactiile serologice care utilizeaza seruri imune cu specificitate cunoscuta (serotipizare).

IMUNITATEA MEDIATA CELULAR

Raspunsul imun mediat celular s-a evidentiat înainte de descoperirea diferentelor functionale dintre limfocitele T si B, odata cu observatia ca unele antigene induc reactii inflamatorii a caror intensitate nu este corelata cu titrul anticorpilor serici. La indivizii la care anticorpii serici nu sunt detectabili, pot fi produse reactii de hipersensibilitate întârziata, ca manifestari directe ale raspunsului imun mediat celular.

În organism, imunitatea mediata celular îndeplineste urmatoarele functii:

– protectia fata de infectiile bacteriene cu localizare intracelulara, fata de infectiile fungice, virale si cele produse de protozoare;

– rezistenta fata de multe tipuri de celule tumorale;

– mediator al proceselor inflamatorii asociate cu diferite procese

infectioase;

– respingerea alogrefelor.

În toate aceste cazuri, reactia imuna mediata celular se declanseaza înainte de sinteza anticorpilor.

Raspunsul imun mediat celular este consecutiv recunoasterii unei structuri antigenice pe suprafata unei celule tinta, de catre limfocitul citotoxic TCD_4 sau TCD_8, ori de catre celulele NK sau K, cu potential litic natural. În general, limfocitele TCD_4 recunosc antigenele prelucrate, sub forma fragmentelor peptidice, pe suprafata celulelor specializate (macrofage), în asociatie cu moleculele CMH II.

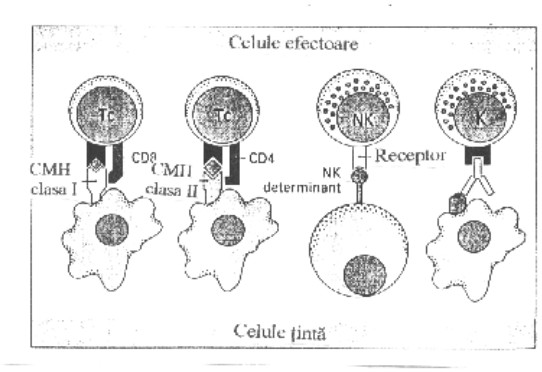


Fig. 72. *Citotoxicitatea* mediata celular. Celulele T (CD_8 si unele celule CD_4) recunosc antigenul asociat cu moleculele CMH. Celulele NK detecteaza absenta moleculelor CMH I autologe pe celula tinta si a unor liganzi putin cunoscuti pe celulele tumorale. Celulele K recunosc regiunea Fc a IgG legat pe antigenele de suprafata ale celulei tinta (dupa Roitt, 1993).

Limfocitele TCD_8 recunosc antigenele prezentate pe suprafata celulelor tinta, în asociatie cu moleculele CMH I. Ele au dimensiuni mici si recunosc celulele proprii infectate cu virusuri sau malignizate, dar si transplantele alogenice sau xenogenice. Limfocitele TCD_8 produc efecte citotoxice asupra celulei tinta, atât *in vivo* cât si *in vitro*.

Procesul mortii celulare sub actiunea limfocitelor Tc specifice, *in vitro*, se desfasoara în trei stadii:

– *stadiul de recunoastere*

– *programarea pentru liza*

– *dezintegrarea celulei tinta.*

Limfocitul Tc *recunoaste* antigenul de pe suprafata celulei tinta,

prin intermediul receptorului de antigen.

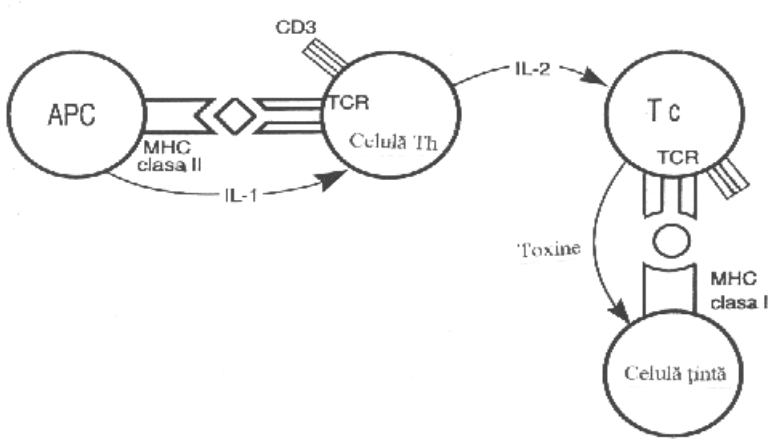


Fig. 73. *Interactiuni celulare* în procesul litic al celulei tinta.

La contactul cu celula tinta, mobilitatea limfocitului Tc se accentueaza si întreaga suprafata a celulei tinta este explorata în câteva minute. Stadiul de recunoastere dureaza circa un minut si necesita obligatoriu prezenta cationilor bivalenti (Ca^{2+}).

Programarea pentru liza consta în eliberarea moleculelor cu efect citotoxic. In spatiul îngust al jonctiunii cu celula tinta, limfocitul Tc elibereaza o proteina citolitica (o limfotoxina) de 70 kD denumita *perforina* si *granzimele* (enzime asociate granulelor): *serin-proteaza* (denumita *granzima B*), *o cistein-aspartic proteaza* (*caspaza)*. Caspazele sunt proteaze din categoria cistein-proteazelor, care necesita pentru actiunea lor, intermediari covalenti cisteinil-aspartat. Ele cliveaza substraturi celulare specifice care produc modificari ale citoscheletului si cromatinei ce declanseaza moartea apoptotica a celulei tinta. Specificitatea stricta a actiunii lor este neobisnuita la proteaze.

Perforina si granzimele sunt principalele molecule ale granulelor celulelor TCD_8 si NK. Actiunea lor este sinergica.

Proteazele determina liza rapida a celulei tinta, iar celelalte proteine cu efect citotoxic actioneaza lent. Perforina se polimerizeaza si formeaza pori transmembranari, cu diametrul de 10 nm. Din acest punct de vedere, modul sau de actiune se aseamana cu C_9 .

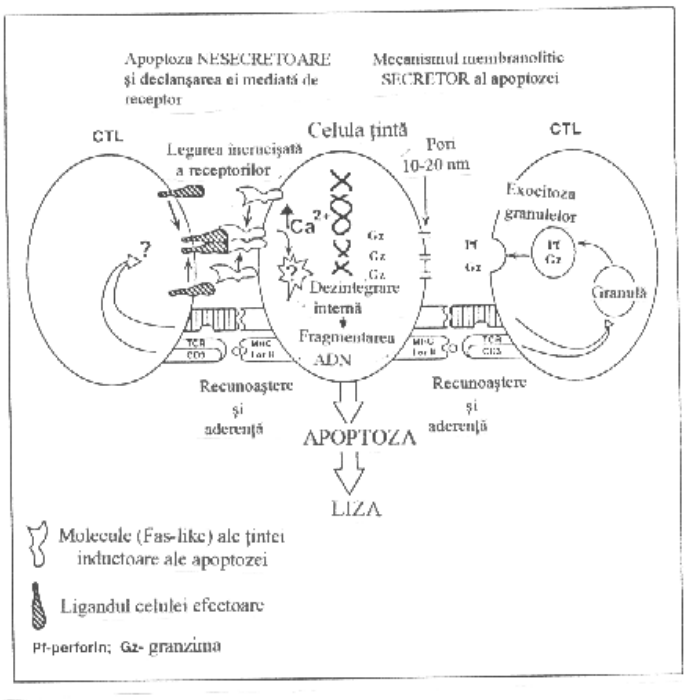


Fig. 74. Ilustrarea schematica a celor doua *mecanisme ale citotoxicitatii*: exocitoza granulelor de perforina/granzima si citotoxicitatea mediata prin interactiunea FasL/Fas, produsa de limfocitele Tc CD_8^+ si CD_4^+.

Dezintegrarea celulei tinta se caracterizeaza prin aparitia leziunilor membranare si dureaza circa 100 minute. Este un proces dependent de temperatura si nu necesita prezenta limfocitului Tc, desi în prezenta sa procesul este accelerat.

Dupa contactul cu o celula tinta, limfocitul Tc se deplaseaza pentru a explora alte celule. Procesul de recunoastere a antigenului este limitat (restrictiv) de identitatea moleculelor CMH I.

Limfocitul Tc este rezistent la actiunea litica a proteinelor proprii, deoarece granzimele sunt sintetizate ca prepropeptide. Dupa clivajul peptidelor leader, moleculele sunt transportate prin cisternele golgiene pâna la granulele omologe lizosomilor. Pentru liza unei celule tinta, limfocitul Tc elibereaza 10% din continutul sau toxic.

Al II-lea mecanism al citolizei, independent de Ca^{2+} si de perforina (descris în 1993) este mediat de interactiunea receptorului *Fas* cu *ligandul Fas* (FasL). Receptorul Fas (CD_{95}) este exprimat pe celula

tinta, iar ligandul Fas (Fas L = $CD_{95}L$) este exprimat pe limfocitele T citotoxice.

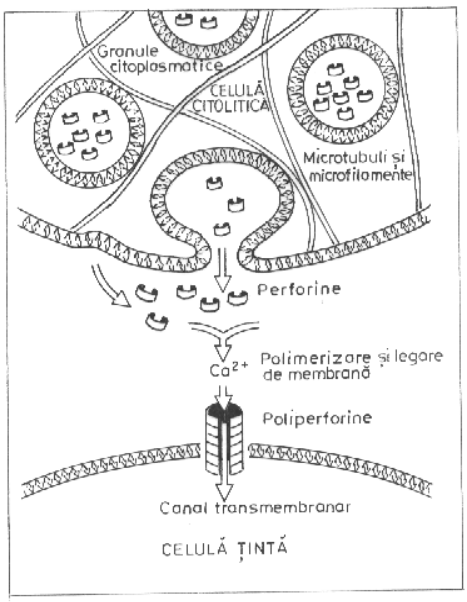


Fig. 75. Reprezentare schematica a rolului *perforinelor citolitice* asupra celulei tinta (dupa Male si colab., 1987).

În concluzie, limfocitele T citotoxice pot media liza celulei tinta, fie prin exocitoza granulelor citolitice, care contin complexul perforina-granzima, fie prin interactiuni între receptorul *Fas* si ligandul *Fas*.

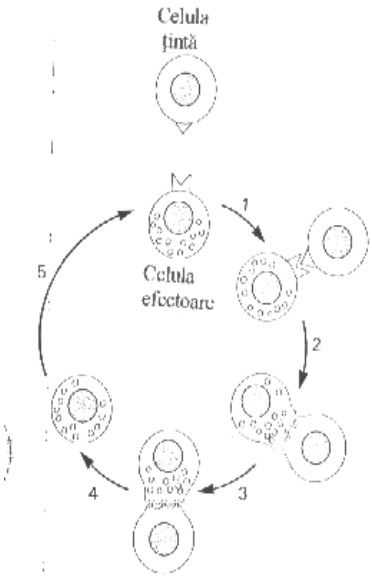


Fig. 76. Dupa eliberarea continutului enzimatic, *celula efectoare* ramâne viabila si functionala fata de alte celule tinta.

Actiunea limfocitelor Tc se evidentiaza *in vitro*, în reactia limfocitara mixta(RLM) uni- sau bidirectionala. În reactia unidirec-tionala, limfocitele organismului A se cultiva în amestec cu limfocitele organismului B, blocate metabolic prin tratament cu mitomicina C sau prin iradiere X. Dupa tratament, proprietatile antigenice ramân nemodificate, dar limfocitele devin neproli-ferante. În 4-5 zile, limfocitele populatiei viabile sunt stimulate, pro-lifereaza si devin citotoxice.

În RLM bidirectionala, se produce activarea concomitenta a celor doua populatii de limfocite Tc cocultivate. Raportul numeric este decisiv pentru evolutia interactiunilor. Limfocitul Tc este supus atacului concertat al câtorva limfocite Tc agresoare si este lizat. Indepartarea ionilor de Ca^{2+} din mediul de cultivare, cu EDTA, previne liza celulei tinta. Probabil, ionii de Ca au un rol esential în exocitoza si în activarea perforinei.

Limfocitele granulare mari (*LGL*, *L*arge *g*ranular *l*ymphocytes) sunt celule non-T, non-B, efectoare ale citotoxicitatii mediate celular si au receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor. Ra-portul nucleo-citoplasmatic este mic, cu multe granule azurofile în citoplasma. Datorita dimensiunilor mai mari si densitatii mai mici, LGL pot fi usor

separate de limfocitele mici, prin centrifugare. Efectul lor citotoxic s-a evidentiat *in vitro,* pentru celulele umane si de soarece. Ele reprezinta 5-10% din totalul limfocitelor circulante si recunosc celulele purtatoare de antigene prin mecanisme distincte.

a) *Celulele NK* (*N*atural *k*iller) se identifica, datorita capacitatii lor de a adera la suportul de plastic, dupa 24 de ore de incubare a limfocitelor izolate din sângele periferic, cu IL-2 recombinant. Astfel, celulele NK pot fi captate pe suportul de plastic si separate de limfocitele T, a caror activare si exprimare a moleculelor membranare de aderenta, necesita o perioada mai lunga de timp. *In vitro*, celulele NK lizeaza spontan o varietate de celule maligne, celule infectate cu virusuri sau celule alogenice, într-o interactiune nespecifica ce nu este restrictiva în raport cu identitatea moleculelor CMH. Imunizarea prealabila a organismului cu celule sensibile, nu ridica nivelul citotoxicitatii nerestrictive în raport cu moleculele CMH si de aceea se numesc “ucigase naturale”.

Nu se cunoaste receptorul prin care celula NK interactioneaza cu celula tinta si nici structura membranara a celulei tinta recunoscuta de celula NK. Moleculele CMH I de pe suprafata celulei tinta, cel putin uneori, inhiba liza mediata de celulele NK, asa cum arata studiile *in vitro*. Aceste observatii au condus la ipoteza ca celulele NK sunt specializate sa recunoasca si sa lizeze celulele cu nivele scazute ale moleculelor CMH I. Activitatea lor citotoxica este stimulata de interferon.

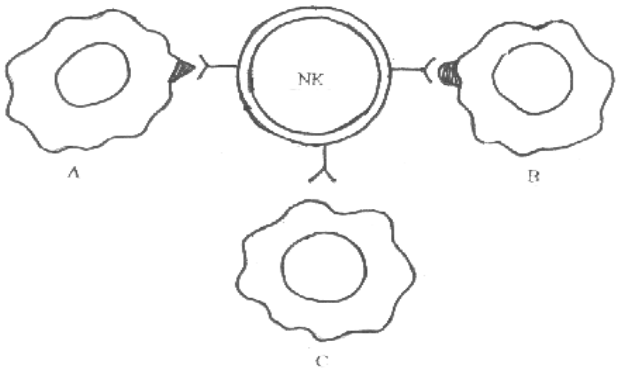


Fig. 77. *Celulele NK* nu lizeaza celulele self normale (A), dar lizeaza celule alogenice (B) sau celulele self care nu exprima molecule CMH clasa I (C). Celula NK exprima cel putin un receptor specific cu rol inhibitor al interactiunii cu moleculele autologe CMH clasa I. Dupa infectia virala sau ca o consecinta a transformarii maligne, celulele autologe pierd o proportie importanta a moleculelor CMH I, fiind înlocuite de peptidele

anormale. In ambele cazuri, aceste celule devin sensibile la liza mediata de celulele NK. Celulele alogenice care exprima molecule CMH I, neînrudite cu moleculele self, sunt lizate deoarece interactiunile dintre receptorii NK si moleculele CMH I nu sunt inhibate eficient.

Efectul litic este rezultatul actiunii unui factor pe care celula NK îl transfera în celula tinta, prin contact intercelular direct. Granulele secretorii contin molecule citotoxice, ca si cele secretate de limfocitele Tc.

Celulele NK par a avea un rol foarte important în rezistenta organismului fata de celulele tumorale si în liza celulelor infectate cu virusuri. Actiunea lor este detectabila la 2-3 zile dupa infectia virala, precedând astfel actiunea efectorilor limfocitelor Tc specifice si a anticorpilor.

b) *Celulele K* sunt limfocite granulare mari (LGL), dar se deosebesc de celulele NK, prin prezenta receptorilor membranari de înalta afinitate pentru Fc γ. Celulele K interactioneaza cu celulele tinta prin intermediul moleculelor de IgG. Celulele tumorale sau cele infectate cu virusuri leaga moleculele de IgG pe suprafata lor, la nivelul situsurilor antigenice si expun fragmentul fragmentul Fc. Acesta functioneaza ca adaptor, permitând celulei K, prin intermediul receptorului pentru Fc, sa recunoasca si sa lizeze celulele tinta tapetate cu anticorpi. Liza celulei tinta, mediata de receptorii pentru regiunea Fc, este cunoscuta sub denumirea de *citotoxicitate mediata de anticorpi* (*ADCC* = *a*ntibody *d*ependent *c*ell *c*ytotoxicity).

Fenomenul ADCC s-a demonstrat indirect, *in vivo*, la pacientii injectati cu AMC specifici fata de antigenele unor celule tumorale (melanom, limfom al celulelor B): se produce liza extensiva a celulelor tumorale, atât prin fenomenul ADCC, cât si liza consecutiva fixarii complementului.

Alte celule LGL sunt limfocitele NK activate *in vitro*, sub actiunea IL-2, cunoscute sub denumirea de celule *LAK* (*l*ymphokine *a*ctivated *k*iller).

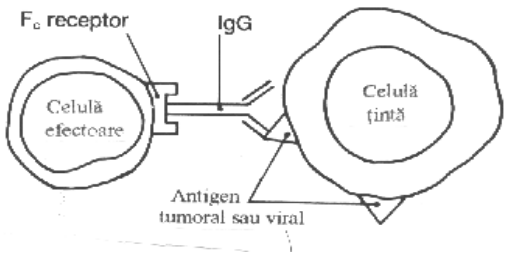


Fig. 78. Ilustrarea schematica a mecanismului *citotoxicitatii mediate de anticorpi*

(ADCC).

Dupa activarea cu stimuli exogeni (de exemplu, IL-2), unele limfocite T si celulele NK se activeaza: cresc ca dimensiuni, creste numarul granulelor si dobândesc capacitatea de a lega si de a liza un spectru larg de celule tumorale, celule infectate cu virusuri sau chiar celule tisulare normale. Astfel de celule efectoare, activate de IL-2, s-au denumit *LAK* (*l*ymphokine *a*ctivated *k*iller). Celulele LAK se definesc ca limfocite care mediaza citotoxicitatea nerestrictiva în raport cu moleculele CMH, fata de o varietate de tinte, dupa activarea *in vivo* sau *in vitro* numai cu IL-2 sau în amestec cu alte citochine. Celulele LAK nu reprezinta o categorie speciala de limfocite, ci deriva preponderent din celulele NK, dar si din limfocitele T. Mai putin de 1% din totalul celulelor T, care mediaza citotoxicitatea nerestrictiva în raport cu moleculele CMH, sunt pre-cursorii celulelor LAK. Ce-lulele LAK secreta citochine: TNF-α si interferon.

Celulele purtatoare de molecule nonself (malig-nizate sau infectate cu virusuri) sunt recunoscute de monocite si chiar de PMN eozinofile, care au activitate litica asupra celulelor tinta.

Macrofagele si monocitele activate sunt mai mari decât celulele în repaus, exprima mai intens moleculele CMH II si au continut lizosomal mai bogat.

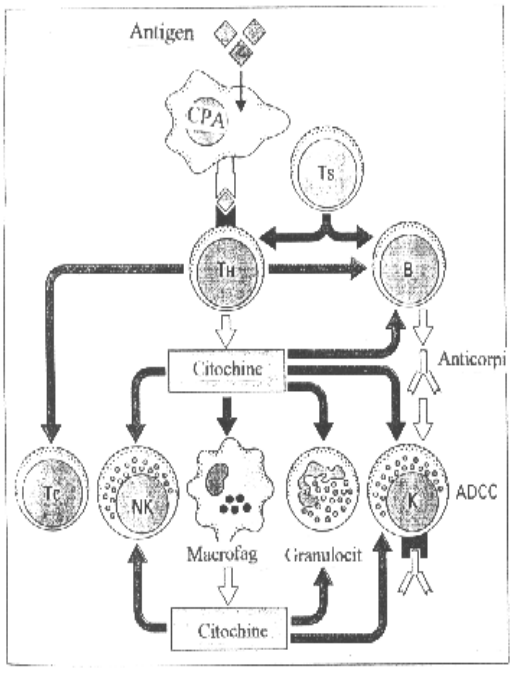


Fig. 79. *Celulele Th* au rol esential în IMC. Celulele accesorii prelucreaza antigenul si îl prezinta limfocitelor Th. Prin intermediul IL pe care le secreta, limfocitele Th selecteaza si activeaza mecanismele efectoare adecvate. Ele pot stimula celulele B sa se diferentieze în celule producatoare de anticorpi, sa stimuleze sau sa inhibe alte categorii de celule efectoare: Tc, NK, macrofage, granulocite si celule K mediatoare ale citotoxicitatii mediate de anticorpi (dupa Roitt, 1993).

Macrofagele se activeaza sub actiunea IFN γ, a endotoxinelor bac-teriene, dupa infectia cu bacterii intracelulare (*Mycobacterium, Listeria*). Activarea consta în amplificarea ratei metabolice. Macrofagul activat devine citotoxic pentru celula tinta. Interactiunea macrofagului cu celula tinta nu este mediata de structuri specifice, dar macrofagul activat face discriminare între celulele modificate (malignizate sau infectate cu virusuri) si cele normale. Macrofagele activate fagociteaza intens si realizeaza efectul ADCC. Ele produc IFN α cu efect activator asupra celulelor NK, secreta oxid nitric (NO), toxic pentru celula tinta, H_2O_2, produsi de oxidare a glucozei cu efect toxic asupra tintei, secreta IL-1, TNF (*t*umour *n*ecrosis *f*actor), colagenaza.

TNF este o pro-teina citotoxica cu efect lent (48-72 de ore) asupra celulei sensibile, foarte asemanatoare limfotoxinei produsa de limfocitele Tc activate. Ambele sunt proteine hidrofobe si se leaga cu mare afinitate de aceiasi receptori ai celulei tinta.

Eozinofilele au rol important în apararea fata de viermii paraziti, prin efecte de citotoxi-citate de tip ADCC. Fo-carele de parazitoza sunt asociate cu eozinofilie.

Oricare ar fi celu-lele efectoare ale citotoxicitatii mediate celular, limfocitele Th (subsetul Th1) au rol esential în stimularea reactivitatii imunitare mediate celular, prin intermediul cito-chinelor, în special IL-2 si IFN.

MEDIATORII MOLECULARI AI REACTIVITATII IMUNITARE

Raspunsul imun este controlat atât prin interactiuni directe ale diferitelor tipuri de celule cooperante, cât si prin produsele de sinteza pe care acestea le secreta.

Factorii moleculari cu rol în reglarea raspunsului imun, initial, au fost denumiti *citochine*. Citochinele cunoscute sunt împartite în urmatoarele grupe functionale: *CSF* (Colony Stimulating Factors), *IL* (Interleuchine), *IFN* (Interferoni) si *TNF* (Tumor necrosis factor), *factori de crestere* si *chemochine*.

Citochinele sunt proteine inductibile, care pot fi secretate de orice celula din organism, cu posibila exceptie a eritrocitelor.

Citochinele sunt molecule cu activitate biologica, în concentratii

foarte mici (femto-molar = 10^{-15}), care induc un raspuns specific al celulelor sensibile. Acestea poseda receptori de mare afinitate pentru diferite citochine si raspund prin modificarea ratei sintezei ARN si a proteinelor. Citochinele sunt parte integranta a conceptului lui C. Bernard, privind homeostazia mediului intern.

Activitatea citochinelor se manifesta *in vivo* si *in vitro*, la concentratii foarte scazute si din aceasta cauza au fost denumite *imunohormoni* sau hormoni reglatori ai raspunsului imun. Spre deosebire de hormoni, care actioneaza la distanta, citochinele actioneaza la nivel local, iar mecanismul actiunii lor este similar cu acela al hormonilor peptidici.

Spectrul de actiune al citochinelor este foarte larg, fiind implicate în toate aspectele patologice. Citochinele nu au activitate enzimatica, dar produc efectele numai dupa ce se leaga de receptorii specifici de mare afinitate, ai celulelor sensibile. Cele mai multe celule au un numar mic de receptori (sute, pâna la câteva mii). Pentru a produce un raspuns maxim, numai un procent al receptorilor trebuie sa lege citochina specifica. Se activeaza caile de semnalizare intracelulara si eventual se produce comutarea unui set de gene, care codifica diferite proteine: molecule de aderenta intercelulara, proteaze, proteine de faza acuta, enzime ale catabolismului lipidic, NO-sintaza si citochine, inclusiv cea care a produs stimularea initiala a celulei.

În functie de efectele pe care le produc, IL se grupeaza astfel:

– IL care stimuleaza mobilitatea orientata a celulelor (chemochine)

– IL care modifica rata (stimulare sau inhibitie) diviziunii celulelor si diferentierea lor

– IL stimulatoare sau inhibitoare ale functiilor specifice ale unor celule

– IL care modifica viabilitatea celulelor (induc apoptoza).

Caracteristicile generale ale citochinelor sunt urmatoarele:

– majoritatea citochinelor sunt polipeptide sau glicoproteine cu gr. mol. între 5- 30 kD;

– multe formeaza homodimeri sau homotrimeri (IL-12 este un heterotrimer);

– sinteza lor constitutiva este minima sau absenta;

– actiunea lor este limitata, *autocrina*, *paracrina sau chiar intracrina*, dar nu endocrina, desi unele se gasesc în sânge în timpul infectiilor generalizate. Actiunea lor este mediata de receptori de mare afinitate. Unele citochine au spectru larg de actiune, dar cel putin unele efecte ale lor se manifesta asupra celulelor hematopoetice. Citochinele actioneaza adeseori prin stimularea sintezei sau inhibitiei altei citochine (cascada de citochine) sau prin modularea exprimarii receptorilor

pentru alte citochine. Uneori, citochine cu structuri moleculare diferite au actiuni asemanatoare (redundanta). O singura citochina actioneaza asupra mai multor tipuri de celule si produce actiuni multiple (pleiotropism). De obicei, celulele în organism sunt supuse actiunii concomitente a mai multor citochine cu efect sinergic sau antagonic.

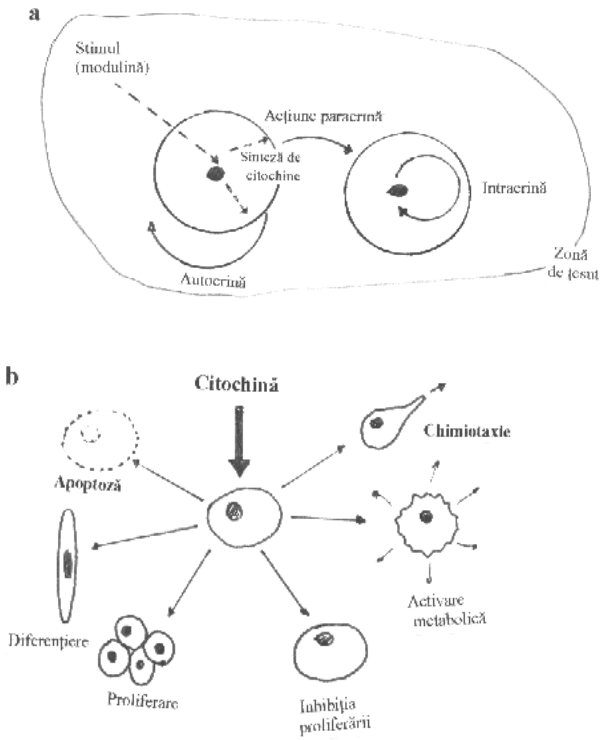


Fig. 80. **a**. *Actiunea citochinelor* este, în general, locala. Rareori, ele se gasesc în cantitati semnificative în sânge. Actiunea locala a citochinelor este *intracrina* (în interiorul celulei), *autocrina* (autostimularea celulei producatoare) si *paracrina* (actiunea asupra celulelor din proximitatea situsului sintezei). Semnalele locale pe care le transmit diferitele citochine sunt esentiale pentru mentinerea homeostaziei celulare, tisulare si a organismului. **b**. Reprezentare diagramatica a *spectrului de activitati* pe care le induc citochinele asupra celulei eucariote. Cele mai importante sunt activarea metabolismului si a sintezei diferitelor proteine (ciclooxigenaza, enzime proteolitice, NO-sintaza), diferiti receptori de aderenta. Citochinele pot sa modifice ciclul celulei sensibile, producând stimularea diviziunii, inhibitia ei sau apoptoza. Chemochinele sunt o clasa de citochine mici, care determina migrarea orientata a leucocitelor.

INTERLEUCHINE (IL)

Denumirea veche de *limfochine* sugereaza ca ele sunt sintetizate în primul rând de *limfocite*. Pentru citochinele produse de celulele seriei monocit-macrofag se foloseste denumirea de *monochine*. Denumirea de *interleuchine* este mai adecvata, deoarece reflecta rolul lor esential, acela de a media cooperarea celulelor sistemului imunitar.

Interleuchinele sunt *peptide hidrosolubile*, cu rol reglator, sintetizate în special de limfocite, dar si de alte celule. Efectul lor se exercita, în primul rând asupra celulelor limfoide, dar si asupra altor celule.

Producerea interleuchinelor, *in vitro*, s-a evidentiat în 1962, prin tehnica incubarii celulelor din exudatul peritoneal de soarece, în tuburi capilare plasate în ambianta materialului solubil eliberat de limfocitele sensibilizate dupa stimularea cu antigen, *in vitro*. Factorul solubil produs de limfocitele stimulate, inhiba migrarea macrofagelor din tubul capilar si s-a denumit *f*actorul *i*nhibitor al migrarii *m*acrofagelor (MIF).

Producerea interleuchinelor *in vivo* s-a recunoscut în 1967, dupa ce s-a remarcat ca procesele inflamatorii sunt mult mai intense în raport cu titrul anticorpilor sintetizati si ca ele sunt dependente de eliberarea unor factori din limfocitele T activate si din macrofage. Interleuchinele au rolul de a recruta alte celule, pe care le atrag în focarul inflamator.

Pâna la descoperirea interleuchinelor ramasesera neexplicate modalitatile prin care, o multitudine de celule neconectate anatomic, îsi coordoneaza activitatea în sensul elaborarii raspunsului imun, dupa stimularea antigenica.

Sinteza IL este dovedita de urmatoarele observatii:

– existenta liniilor limfoide, a caror crestere *in vitro* este dependenta de IL. Aceste linii celulare se folosesc pentru testarea prezentei IL într-un lichid biologic;

– unele clone de limfocite, dupa stimularea *in vitro* cu lectine, produc cantitati mari de IL, utilizabile pentru analiza biochimica.

In vivo, IL sunt produse de limfocitele T (mai putin de limfocitele B), de celulele seriei monocit-macrofag, de celulele endoteliului vascular, de fibroblastele tesutului conjunctiv, de cheratinocite etc.

IL-1

Sursa majora de IL-1 o reprezinta *fagocitele mononucleare* (celulele seriei monocit-macrofag). Dar orice tip de celula nucleata

matura poate sa sintetizeze IL-1: cheratinocitele, celulele dendritice, astrocitele, microglia, limfocitele B normale, unele clone de limfocite T *in vitro*, celulele NK, neutrofilele, fibroblastele, celulele endoteliale, celulele musculare netede.

Sinteza IL-1 este indusa de actiunea unor stimuli biologici (endotoxinele bacteriilor Gram negative, exotoxinele, mureina bacteriilor Gram pozitive, zimosanul din peretele celular al levurilor, complexele imune, C3a, citochinele limfocitelor activate, lectinele mitogene) sau nebiologici (particule de Si, cristale de urati).

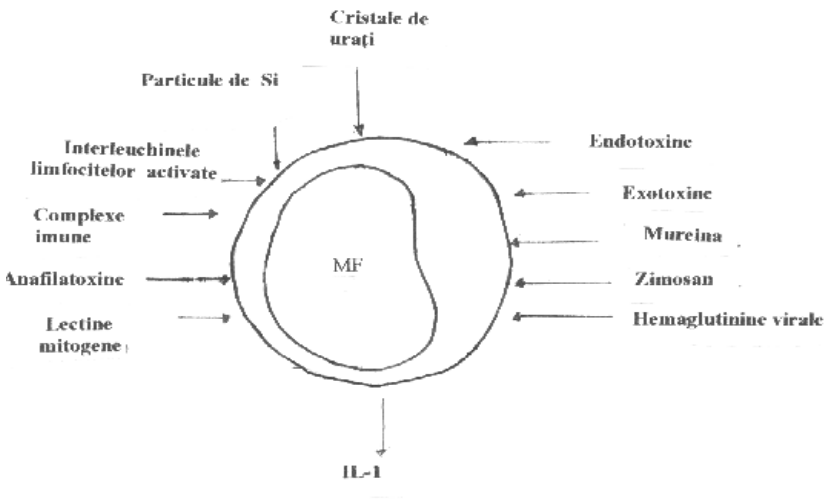


Fig. 81. *Agentii declansatori* ai sintezei IL-1.

Sunt doua variante moleculare (IL-1 α si IL-1β), codificate de gene distincte. S-a identificat a III-a varianta moleculara, IL-1ra (*r*eceptor *a*ntagonist), care se fixeaza pe receptorii pentru IL-1 α si IL-1 β, inhibând efectele lor. IL-1 α si IL-1 β se sintetizeaza ca precursori de 31kD (271 si respectiv 269 aminoacizi), care sunt clivati proteolitic si rezulta molecule de 17 kD. IL-1 este activa atât în varianta nativa, cât si forma rezultata dupa clivare. IL-1 β este clivata de o cistein-proteaza intracelulara (ICE = *i*nterleukin *c*onverting *e*nzyme).

Efecte. Dupa ce este produsa local de celulele stimulate, IL-1

actioneaza *autocrin* sau *paracrin*, stimulând raspunsul inflamator si raspunsul imun specific, fiind un mesager cu spectru larg de actiune. IL-1 este un mediator pleiotropic (cu efecte multiple) al raspunsului gazdei la infectii sau la leziuni:

– stimuleaza producerea altor citochine (G-CSF, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-11, PDGF);

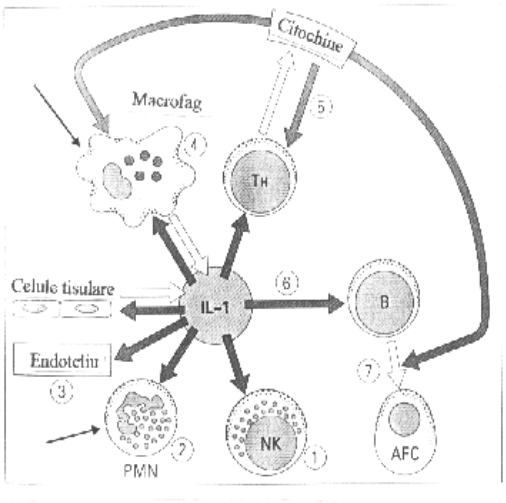


Fig. 82. IL-1 este produsa de multe tipuri celulare ca raspuns la leziuni, infectie sau dupa stimularea antigenica si influenteaza multe categorii de celule si procese; stimuleaza activitatea citocida a celulelor NK; activeaza metabolismul PMN si chimiotaxia spre situsul producerii IL-1; induce expresia moleculelor de aderenta în endoteliu si mareste permeabilitatea; stimuleaza chimiotaxia si functia citocida a macrofagelor; stimuleaza proliferarea celulelor Th, exprimarea receptorului pentru IL-2 si pro-ducerea de citochine; stimuleaza proliferarea si dife-rentierea limfocitelor B în celule producatoare de anticorpi.

– stimuleaza prolife-rarea celulelor T, crescând sinteza de IL-2 si exprimarea receptorilor pentru IL-2 pe celulele T;

– induce exprimarea moleculelor CMH II pe CPA;

– stimuleaza diferen-tierea limfocitelor pre-B si maturarea lor în celule B;

– stimuleaza monocitele sa produca IL-1 (bucla autocrina);

– este chemoatractant pentru leucocite la situsul inflamatiei, prin inducerea sintezei moleculelor de aderenta pe endoteliul vascular;

– induce sinteza pro-teinelor de faza acuta (CRP) în ficat;

– este reglatoare a hema-topoezei, contracarând efectele mielosupresoare ale radioterapiei si chimioterapiei prin inducerea sintezei SOD (enzima cu Mn) în mitocondrii;

– stimuleaza producerea de CRH din hipotalamus, cu eliberarea ACTH din hipofiza. IL-1 poate stimula direct eliberarea ACTH. Stimularea axei hipotalamo-corticosuprarenalei induce sinteza glucocorticoizilor. Acestia au efect reglator prin feed-back, inhibând sinteza IL-1, dar stimulând exprimarea receptorilor pentru IL-1;

– pare a avea rol în distrugerea cartilajului articular, sub actiunea unei metaloproteaze produsa de condrocite, care caracterizeaza artrita reumatoida. In aceasta maladie autoimuna, IL-1 activeaza condroclastele si osteoclastele si de aici deriva denumirea ei de *catabolina;*

– stimuleaza proliferarea fibroblastelor;

– *in vitro* are efecte citostatice si citocide pentru unele linii de celule maligne;

– este factorul pirogen endogen, pentru ca stimuleaza sinteza prostaglandinelor (PG*), active asupra centrului hipotalamic al termogenezei, producând febra;

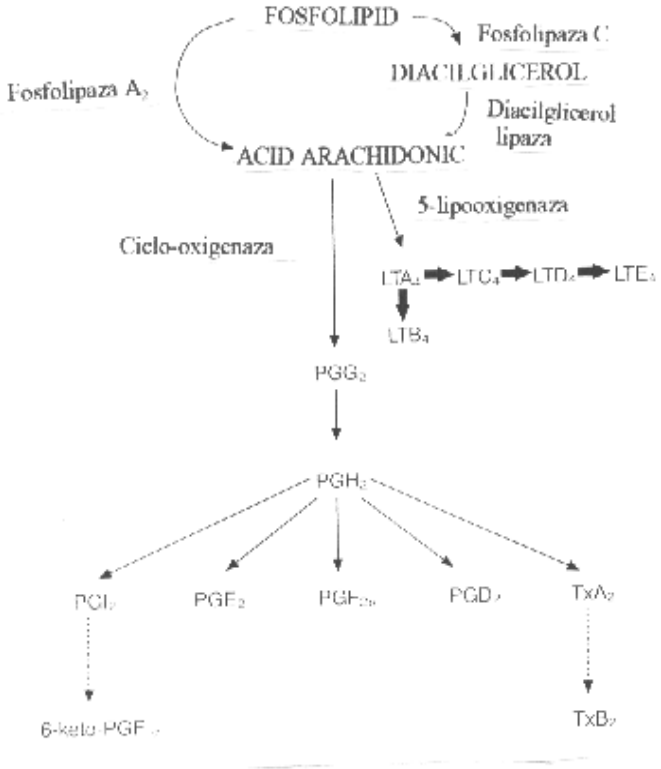


Fig. 83. Caile producerii *compusilor icozanoidici* din fosfolipidele membranare. Liniile groase reprezinta conversia enzimatica, iar cele întrerupte, transformari neenzimatice. PG = prostaglandina; Tx = tromboxan; Lt = leucotriena.

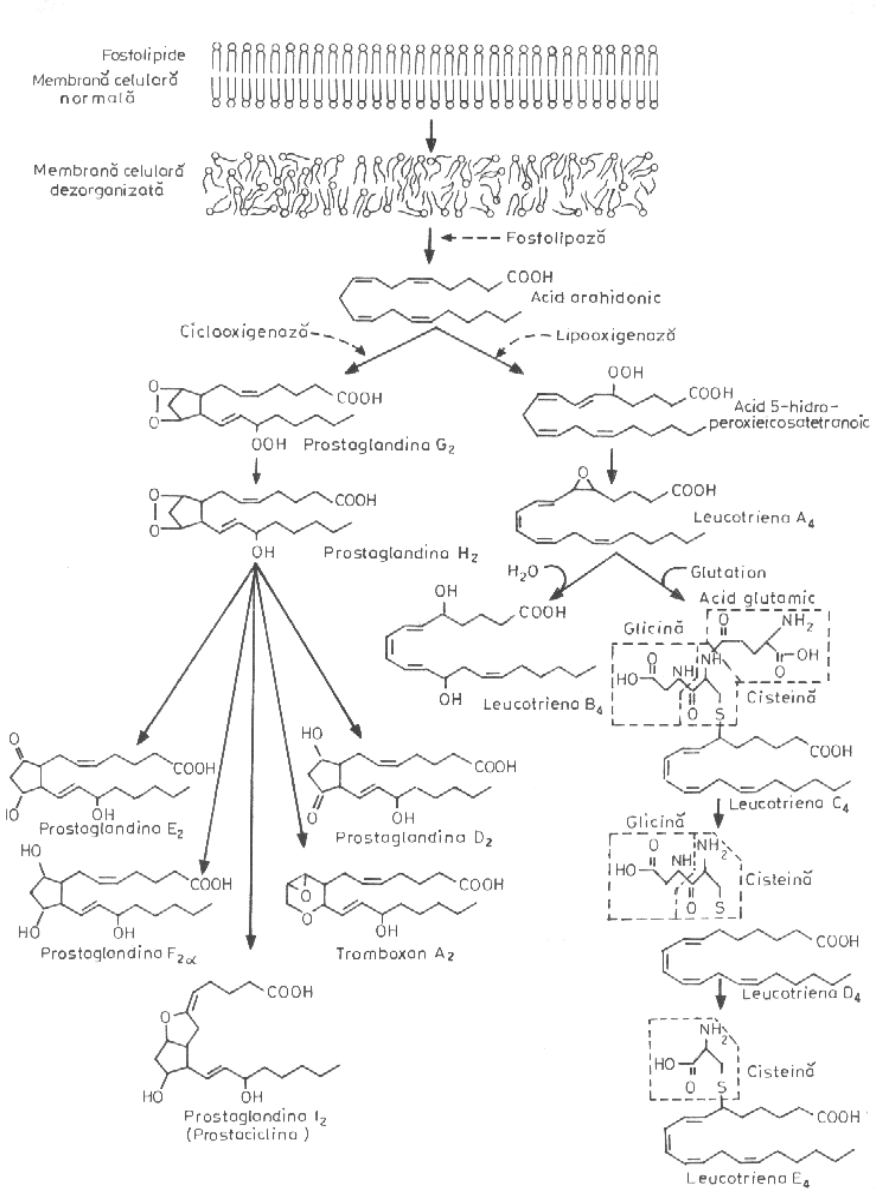


Fig. 84. Reprezentare schematica a "*cascadelor" enzimatice* ce duc la formarea PG si LT, mediatori ai efectelor endotoxice si ai reactiilor inflamatorii.

– stimuleaza proliferarea celulelor B dupa contactul lor cu Ag;

– este factor contrasupresor, deoarece inhiba activitatea celulelor Ts;

– stimuleaza activitatea metabolica a macrofagelor si secretia

enzimelor (colagenaza), usurând mobilitatea lor în substanta fundamentala;

– activeaza limfocitele T si B;

– produce hipozincemie** si hipoferemie si inhiba cresterea si diviziunea celulelor bacteriene;

– asupra cortexului cerebral, IL-1 produce inhibitie (somn), cu unde lente.

IL-2

IL-2 a fost descoperita în 1976 de Gallo, în mediul de crestere al limfocitelor normale, stimulate cu PHA. Denumirea veche a IL-2 este TCGF(T-cell growth factor). IL-2 este principalul hormon cu rol esential în generarea unui raspuns eficient si este factorul esential reglator al raspunsului imun. Este produsa de limfocitele TCD_4 activate. Limfocitele TCD_4 în repaus nu produc IL-2, dar limfocitele Th_1 se activeaza dupa ce recunosc antigenul asociat cu moleculele CMH II si produc IL-2 si interferon γ, iar setul Th_2 produce IL-4, IL-5 si IL-6. Unele clone de limfocite TCD_8 pot produce cantitati mici de IL-2. Limfocitele B infectate cu VEB produc IL-2. *In vitro*, IL-2 este produsa de linii celulare T, dupa stimulare cu PHA sau Con A. Alte linii celulare sintetizeaza IL-2 constitutiv, fara stimularea prealabila cu lectine mitogene.

Conformatia tridimensionala a moleculei de IL-2 este un α-helix, alcatuit din 4 catene

Activitati biologice. IL-2 exercita efect stimulator asupra celulelor care au secretat-o (bucla autocrina), dar si asupra altor limfocite (bucla paracrina), deoarece receptorul de mare afinitate pentru IL-2 se gaseste pe majoritatea celulelor limfoide.

Limfocitele stimulate prolifereaza si exprima, la densitate înalta, receptorii de IL-2 pe suprafata lor. Astfel se produce *expansiunea clonala* a limfocitelor care au recunoscut specific un antigen. Interactiunea IL-2 cu receptorul sau declanseaza activarea si proliferarea celulara.

Rolul primar al IL-2 este expansiunea clonala a limfocitelor CD_4 si CD_8.

IL-2 stimuleaza diferentierea limfocitelor TCD_4, în celule Th_1 sau Th_2. Asupra celulelor Th_1, IL-2 actioneaza autocrin, iar asupra celulelor Th_2 si CD_8 actioneaza ca factor paracrin. Stimuleaza activitatea citotoxica a limfocitelor CD_8.

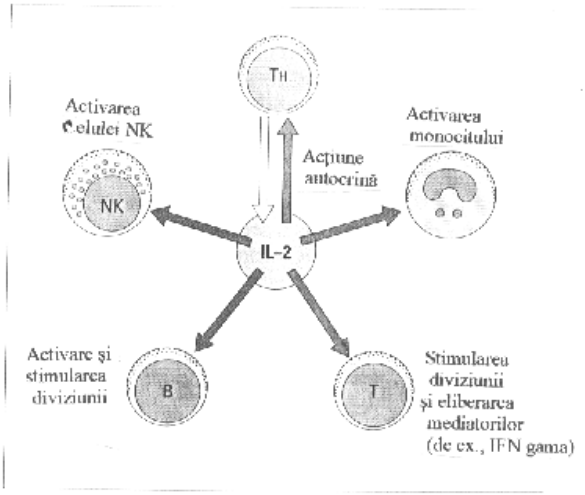


Fig. 85. *IL-2* este sintetizata de limfocitele Th. Rolul sau esential este stimularea celulelor T si eliberarea mediatorilor (IFN γ), dar stimuleaza si cresterea limfocitelor B. Activarea monocitelor si a celulelor NK este importanta pentru amplificarea raspunsului imun. La pacientii cu carcinom renal, precursorii autologi ai celulelor NK pot fi activati *in vitro*, de doze mari de IL-2 (1000 UI/ml) si genereaza celule LAK (lymphokine-activated killer), utilizate experimental în terapia cancerului.

Limfocitele B, dupa stimularea sub actiunea IL-2, se activeaza, exprima receptori de mare afinitate pentru IL-2, prolifereaza intens si secreta IgG, IgA, IgM. IL-2 stimuleaza comutarea izotipica din raspunsul imun secundar.

Celulele NK raspund la efectul stimulator al IL-2 prin cresterea activitatii citotoxice, fara activarea proliferarii.

IL-2 stimuleaza activitatea *macrofagului*, care devine citotoxic pentru celulele tumorale si pentru bacteriile parazite intracelular. Macrofagul stimulat produce H_2O_2, NO, PGE_2 si TNF-α. Activitatea antifungica a granulocitelor creste mult dupa stimularea cu IL-2. Probabil se intensifica producerea de lactoferina si TNF-α.

Sinteza IL-2 este stimulata de IL-1. La rândul ei, IL-2 stimuleaza sinteza IL-4, 5, 6. IL-2 ramâne principala citochina care controleaza raspunsul proliferativ al limfocitelor CD_4.

Sinteza IL-2 este indusa de orice stimul antigenic, dar actiunea ei

este specifica, deoarece determina numai expansiunea clonelor care au recunoscut determinantii antigenici.

Gena codificatoare a IL-2 a fost clonata, ceea ce a permis obtinerea unei cantitati suficiente de IL-2 în stare cristalizata. Este o glicoproteina de 15,4 kD si contine resturi de sialil si glicozil.

S-a clonat gena codificatoare pentru receptorul IL-2. Receptorul este format din 3 catene polipeptidice: IL-2R α (55kD), IL-2R β (75 kd) si catena γ, al carei rol ramâne incert. Catena γ este componenta a receptorilor celulari pentru alte citochine: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 si de aceea a fost notata cu γ *c* (comuna).
S-au identificat trei clase de receptori pentru IL-2:

- receptorul de mare afinitate, format din toate cele trei catene;
- receptorul de afinitate medie, format din catenele α si β;
- receptorul de mica afinitate, format numai din catena α.

Limfocitele nestimulate antigenic au numai receptorul de mica afinitate. Dupa stimularea antigenica primara, se exprima receptorul de afinitate intermediara, iar dupa stimularea secundara se exprima, cu o densitate mare, receptorul de afinitate înalta. Aceasta sugereaza ca intensitatea raspunsului imun este conditionata de disponibilitatea receptorilor de IL-2.

Receptorul de IL-2 functioneaza ca un întrerupator start-stop (on-off). IL-2 interactioneaza initial, cu catena de 55 kD si ulterior, cu cea de 75 kD. Interactiunea este ferma si de aceea, disocierea este lenta. Dupa disocierea IL-2 de receptor, semnalul de activare a limfocitelor dispare.

IL-3 este un polipeptid de 140 aminoacizi la soarece si 133 la om. Este produsa de limfocitele T si de celulele NK, iar mastocitele si eozinofilele stimulate produc cantitati mici de IL-3. In reactiile alergice, IL-3 modifica functiile mastocitelor, eozinofilelor si macrofagelor. Efectele ei se exercita asupra celulelor din imediata vecinatate a celor care au produs-o, dar când se produce o activare masiva a limfocitelor (de exemplu, în infectia gripala), IL-3 apare si în circulatie si efectele ei sunt sistemice. IL-3 stimuleaza activarea celulelor accesorii (granulocite, fagocite, plachete), cu functii de aparare si reparare într-un focar inflamator. Stimuleaza diferentierea celulelor stem în maduva hematopoetica, efectul fiind recuperarea functionala a maduvei osoase consecutiva chimioterapiei citotoxice.

IL-4 este produsa de câteva seturi de limfocite si are efecte multiple asupra celulelor limfoide. Sursa majora de IL-4 sunt limfocitele

patogeni extracelulari. IL-4 actioneaza autocrin si determina stimularea celulelor producatoare. Stimuleaza exprimarea moleculelor CMH II pe celulele B si secretia IgE si IgG_1. De aceea s-a numit factorul stimulator al limfocitelor B. Induce diferentierea celulelelor TCD_4 spre celule Th_2, care la rândul lor secreta IL (IL-5, IL-10) stimulatoare ale RIMH. Este o citochina anti-inflamatorie, producând inhibitia citochinelor inflamatorii (IL-1, TNF) si a PG.

IL-5 este secretata de limfocitele Th_2 si stimuleaza proliferarea si diferentierea limfocitelor B în raspunsul imun. Stimuleaza diferentierea celulelor stem medulare, în monocite si eozinofile. Sinteza crescuta a IL-5 determina eozinofilie.

IL-6 este o citochina multifunctionala, secretata de macrofage, de limfocitele T, de celulele endoteliale. Stimuleaza sinteza IgA în structurile limfoide asociate mucoaselor. Efectele IL-6 sunt sinergice cu ale IL-1. IL-6 este un mediator al raspunsului de faza acuta. Raspunsul de faza acuta este o reactie sistemica anti-inflamatoare, consecutiva infectiei sau leziunii tisulare si se caracterizeaza prin febra, leucocitoza, cresterea permeabilitatii vasculare, scaderea nivelului metalelor (Zn, Fe) si a steroizilor plasmatici, dar creste nivelul proteinelor de faza acuta. Proteinele de faza acuta sunt sintetizate de hepatocite sub actiunea stimulatoare a unui factor specific, iar IL-6 are actiune similara cu aceea a factorului stimulator al hepatocitelor.

IL-7 este produsa de fibroblaste. La soarece, rolul esential al acestei citochine este de a stimula diferentierea celulelor limfoide imature, în limfocite T si B, în special intrarea si mentinerea lor în faza S. Situsurile actiunii sale sunt maduva osoasa si timusul.

IL-8 este produsa de macrofage, fibroblaste, celule endoteliale. Face parte din categoria chemochinelor. Actiunea sa principala este cea chemotactica fata de neutrofile, eozinofile, limfocite T, în focarul inflamator. Sinteza ei rapida este indusa de LPS, de infectia virala, în celulele mononucleare din sânge, în fibroblaste, în cheratinocite. IL-8 stimuleaza activarea neutrofilelor (migrare transendoteliala, eliberarea enzimelor lizosomale, intensificarea metabolismului oxidativ, generarea anionului superoxid în focarul inflamator). Are efecte asupra celulelor nelimfoide: este haptotactica(induce migrarea celulelor epiteliale spre suprafata).

IL-9 este sintetizata de limfocitele T si determina efecte multiple asupra celulelor stem hematopoetice, limfopoetice si neuronale.

Actiunea sa este sinergica cu IL-4. In absenta IL-4, IL-9 stimuleaza activarea limfocitelor B si sinteza IgE si IgG.

IL-10 are rol reglator important asupra sintezei diferitelor citochine. Este produsa de limfocitele T activate, de monocite, de celulele B, de cheratinocite(dar si de celulele carcinomului de colon, de melanoame). Celulele Th_2 constituie sursa principala de IL-10, dar este produsa de clone Th_1 dupa stimularea cu antigenul specific. Efectele sale multiple se exercita asupra limfocitelor, monocitelor, celulelor NK, celulelor dendritice. Inhiba activarea macrofagelor si exprimarea moleculelor CMH II pe suprafata lor. Inhiba sinteza citochinelor proinflamatorii.

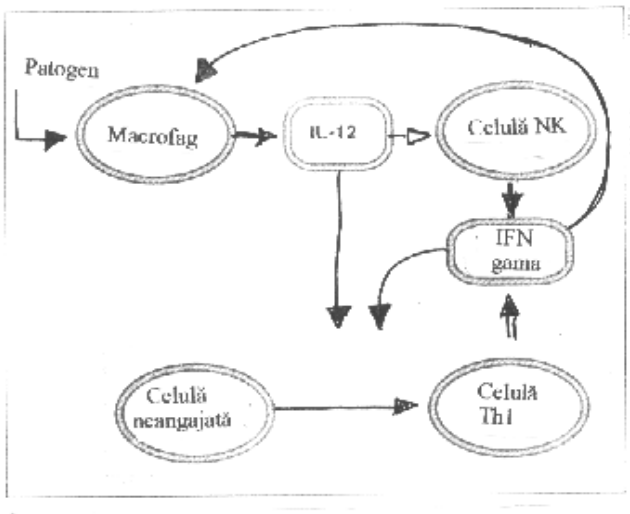


Fig. 86. IL-12 este produsa de macrofage si are rol central în raspunsul imun. IL-12 stimuleaza celulele NK si T sa elibereze interferon γ, iar celulele T neangajate sunt stimulate sa se diferentieze spre fenotipul Th1.

IL-11 are ase-manari functionale cu IL-6, dar are un spectru mai restrâns de actiune. Efectele sale se exercita asu-pra sistemului hema-topoetic, limfopoetic, hepatic, adipos si neuronal. Este proin-flamatorie si induce sinteza proteinelor de faza acuta.

IL-12 s-a iden-tificat în superna-tantul liniilor celulare B transformate, însa celulele B normale (de om si soarece) nu sintetizeaza cantitati semnificative de IL-12. Sursele principale sunt macrofagele si celulele dendritice. Macrofagele - primele celule care recunosc antigenul, încep sa produca IL-12. Celulele tinta ale IL-12 sunt limfocitele T (CD_4, CD_8) si NK. *In vivo*, IL-12 induce diferentierea limfocitelor TCD_4, în celule Th_1 care sintetizeaza interferon γ, inductor al anemiei, neutropeniei si limfopeniei. Este o citochina de *initiere* a

raspunsului imun, fiind puntea de unire între reactiile de aparare nespecifica si raspunsul imun specific. Stimuleaza diferentierea celulelor Th neangajate, în celule Th_1, mediatoare ale RIMC.

IL-13 este produsa de celulele Th_2, dar si de alte seturi de celule Th, de celulele TCD_8, de alte celule activate (mastocite, eozinofile, bazofile). Induce proliferarea limfocitelor B care sintetizeaza IgE si IgG_4, sugerând rolul sau în patogeneza starilor alergice. Inhiba activarea macrofagelor si sinteza citochinelor proinflamatorii, având astfel proprietati anti-inflamatorii.

IL-15 are multe activitati biologice comune cu ale IL-2. Catenele β s i γ ale receptorului pentru IL-15 sunt comune si pentru receptorul de IL-2, iar catena α este specifica. IL-15 are o distributie tisulara mai larga decât IL-2. Este factor de crestere pentru celulele T (umane si de soarece), pentru celulele B si NK. Are actiune sinergica cu IL-12. IL-15 se gaseste în lichidul sinovial la pacientii cu artrita reumatoida, unde recruteaza limfocitele T si le stimuleaza pentru a produce IFN γ, TNF-α si GM-CSF. Rolul reglator al IL-2 nu este compensat de IL-15 si nici de alte citochine.

Alte citochine

Celulele limfoide si macrofagele sintetizeaza factori proteici, denumiti *limfotoxine*, cu efect litic asupra celulelor sensibile. Limfotoxina s-a evidentiat initial, ca un factor citotoxic în supernatantul limfocitelor activate.

Limfotoxinele sunt produse de limfocitele TCD_8, de celulele NK si de macrofagele stimulate. Denumirea de “limfotoxine” deriva de la efectul lor citotoxic sau citostatic, fata de celulele malignizate sau fata de cele infectate cu virusuri.

Limfotoxina produsa de limfocitele Tc se numeste *perforina* si are rol major în liza celulei tinta.

Limfotoxina poate fi produsa ca proteina solubila sau ca proteina asociata membranei citoplasmatice a unor celule. Forma solubila a limfotoxinei este alcatuita din trei monomeri de limfotoxina α (LT α) si este produsa de celulele Tc (CD_8) si de subsetul Th-1 al limfocitelor CD_4.

Limfotoxina se exprima si pe suprafata celulelor T, într-o alta varianta biochimica: o subunitate proteica a LT-α, asociata cu doua molecule de LT-β.

Macrofagele stimulate cu endotoxine, sintetizeaza o monokina de

17 kD, denumita TNF-α sau *casectina*.

TNF-α este o glicoproteina de 156 aminoacizi, trimerica, produsa în primul rând de macrofage dar si de alte celule: adipocite, limfocite B, cheratinocite, fibroblaste, granulocite, mastocite, monocite, celule NK, celule musculare netede, celule T.

Factorii inductori ai sintezei TNF-α sunt foarte numerosi: celulele alogenice si bacteriene, peptidoglicanul, complexele imune, LPS, intermediarii reactivi ai reducerii O_2, celule malignizate, infectia virala, zimosanul din peretele levurilor, ionii de Zn etc.

Efecte. TNF-α inhiba ciclul de replicare virala si stimuleaza diferite activitati biologice: diferentierea monocitelor în macrofage, activitatea ADCC, sinteza moleculelor CMH I si II, activitatea fagocitara, cresterea si proliferarea fibroblastelor, este un factor pirogen, hipotensiv, favorizeaza regenerarea ficatului, induce sinteza proteinelor de faza acuta si apoptoza celulelor tinta, activeaza celulele endoteliale, stimuleaza distrugerea cartilajului, activeaza limfocitele T si B, stimuleaza sinteza Ig. Local, TNF-α mareste aderenta limfocitelor TCD_8 la endoteliul vascular si le stimuleaza citotoxicitatea. Este o citochina proinflamatorie.

TNF-α este implicat direct în distrugerea celulelor B insulare, în diabetus melitus insulino-dependent.

Denumirea de *casectina* pentru TNF-α deriva de la efectul ei stimulator asupra catabolismului, ceea ce explica aparitia si manifestarea *sindromului de epuizare* (casexia), caracterizat prin pierderea în greutate, la pacientii neoplazici sau cu infectii cronice. Casectina inhiba transcrierea genelor care codifica sinteza enzimelor lipogene.

Receptorii de casectina se gasesc pe hepatocite, pe celulele musculare si adipoase si raspund prin intensificarea catabolismului. Ca urmare, trigliceridele sunt mobilizate din depozite si creste concentratia plasmatica a lipoproteinelor cu densitate foarte mica.

Factorul inhibitor al migrarii macrofagelor (MIF) este prima limfochina ale carei efecte au fost descrise. Inhibitia migrarii macrofagelor este produsa de o varietate de factori: citochine, mitogene, toxine. Sub denumirea de MIF a fost caracterizata o proteina de 12, 5 kD din umoarea apoasa a camerei anterioare a globului ocular, care produce supresia rapida a citotoxicitatii mediata de celulele NK, fata de endoteliul corneean. Camera anterioara a globului ocular este considerata ca situs privilegiat din punct de vedere imunologic. Tesuturile sale (endoteliul corneean si cristaloida) nu exprima molecule CMH I si astfel devin tinta atacului litic al celulelelor NK infiltrate. Activitatea inhibitorie a MIF a fost anulata de anticorpii specifici anti-MIF.

INTERFERONII SI MECANISMELE ACTIUNII LOR

Interferonii sunt o categorie speciala de *citochine*, a caror sinteza este indusa de diferiti agenti chimici sau biologici. Functiile lor se caracterizeaza printr-un spectru larg de activitati nespecifice, cea mai importanta fiind *inductia starii antivirale*.

Interferonul a fost descoperit de Isaacs si Lindenmann (l957). Ei au observat ca injectarea membranei corioalantoice a embrionului de gaina, cu virus influenza inactivat (denumit virus *inductor* sau *interferent*), blocheaza replicarea ulterioara a virusului influenza infectios (virus *revelator* al interferentei). Autorii au aratat ca inhibitia replicarii virale (interferenta) se datoreaza unui factor inhibitor, pe care l-au denumit *interferon (IFN)*.

Elucidarea naturii chimice si a modului de actiune a interferonilor a constituit o problema de interes major a biologiei moleculare si a virologiei în ultimele decenii.

Inducerea starii antivirale este cea mai importanta functie a interferonilor, dar ei au si alte activitati biologice majore:

- inhibitia multiplicarii celulelor normale si tumorale
- reglarea proceselor de diferentiere celulara
- reglarea functiei imunitare.

Natura interferonilor. Diferitele variante moleculare de interferoni au fost grupate în doua tipuri: interferoni de tip I si de tip II. Interferonul de tip I cuprinde variantele α, β si τ. Interferonul de tip II include varianta moleculara γ. Interferonul α este produs de leucocite si este reprezentat de o varietate larga de molecule, codificate de un numar mare de gene. Interferonul β este sintetizat de variate celule nehematopoetice (de exemplu, fibroblaste), dupa infectia cu virus sau dupa ce sunt stimulate cu ARN dublu catenar. Sinteza sa este codificata de o singura gena. Interferonul τ, s-a identificat la bovine si la ovine si este sintetizat în cantitati mari în epiteliul uterin, în perioada care precede implantarea embrionului si de aceea s-a denumit interferon *t*rofoblastic. Interferonul γ este produs de limfocitele activate sub actiunea antigenului specific sau a substantelor mitogene si reprezinta interferonul de tip II. Deoarece, *in vivo,* este sintetizat de limfocitele T activate, de limfoblastele seriei B si de limfocitele granulare mari (celulele NK), interferonul γ este considerat a fi *de tip imun*.

Distributia interferonilor în cele doua tipuri si subtipuri se bazeaza

pe proprietatile lor antigenice individuale. Antiserul specific fata de moleculele de interferon ale unui tip nu precipita si nu neutralizeaza actiunea interferonilor celuilalt tip.

În general, moleculele de interferoni sunt glicoproteine. Interferonii β si γ au resturi glucidice legate la asparagina 80 si respectiv 25 si 97. Majoritatea interferonilor α nu sunt glicozilati. Glicozilarea nu este esentiala pentru exprimarea activitatilor biologice, ceea ce explica faptul ca interferonii sintetizati în celulele bacteriene, de genele codificatoare clonate, au activitate biologica.

Interferonii α si β sunt stabili chiar la pH 2 si îsi pastreaza activitatea în prezenta SDS, ultima fiind o proprietate foarte importanta pentru purificare.

Sinteza interferonilor. In mod obisnuit, celulele normale nu sintetizeaza cantitati detectabile de interferoni. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza interferonilor este indusa de diferiti agenti: virusuri infectioase sau inactivate, moleculele de ARN dublu catenare helicale, endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Brucella* sp., *Listeria monocytogenes*), infectia cu micoplasme, cu rickettsii si chlamidii, polimerii sintetici, mananii (polizaharide), diferiti activatori metabolici etc. LPS este un bun inductor al IFN α si β.

Pentru virusurile cu genom ARN dublu catenar, inductorul sintezei de interferon este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu exceptia celor din grupul pox, sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN monocatenar sunt inductoare ale sintezei interferonilor, deoarece ARN se replica printr-un intermediar dublu catenar.

ARN monocatenar, ADN mono- sau dublu catenar, ca si hibrizii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei interferonilor.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca si cele ce infecteaza un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei interferonilor. În leucocitele mononucleare, sinteza IFN este indusa de glicoproteinele învelisului viral.

In vitro, la 37^{o}, sinteza începe la 4 ore dupa infectia virala si atinge rata maxima concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Informatia genetica codificatoare a sintezei interferonilor este distribuita în trei familii de gene. Sinteza interferonului α este codificata de l4 gene si 7 pseudogene, localizate pe bratul scurt al cromosomilor perechii a 9-a. Interferonul β este codificat de o gena (sau câteva), cu aceiasi localizare, iar interferonul γ este codificat de o singura gena localizata pe perechea a l2-a de cromosomi. Ca o caracteristica, nici una din gene nu contine introni.

Cel mai bun inductor al sintezei de interferon este ARN dublu

catenar natural sau sintetic. Mecanismul inductiei nu este cunoscut. Probabil, ARN dublu catenar induce sinteza unui factor, care, la rândul sau neutralizeaza represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inductiei este însasi natura bicatenara a moleculei de ARN si nu informatia genetica înscrisa în ea. Nu se cunoaste nici mecanismul inductiei sintezei interferonului γ (de tip imun), în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene.

Inductia sintezei interferonilor necesita sinteza ARNm si traducerea sa în catena polipeptidica. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomocina D), administrati simultan cu inductorul, inhiba sinteza interferonilor.

Interferonii secretati de diferite specii de organisme sau de diferite categorii de celule ale unui organism, prezinta deosebiri legate de secventa aminoacizilor, de continutul glucidic, care au stat la baza gruparii lor în cele trei clase.

Toti interferonii se sintetizeaza ca precursori de l66 aminoacizi, cu secvente semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secretiei. Dimensiunle reale ale catenei polipeptidice sunt de l43, l45 si respectiv de l46 resturi de aminoacizi.

Molecula de interferon are doua domenii cu secvente de aminoacizi relativ constante: unul în jumatatea N-terminala, care formeaza situsul de legare pe receptorul celular, iar celalalt, în jumatatea C-terminala, pare sa moduleze legarea de receptor si probabil mediaza functiile biologice.

Studiul biochimic al moleculei de interferon a fost înlesnit de obtinerea anticorpilor monoclonali specifici fata de diferite tipuri de interferon.

Interferonii se sintetizeaza, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Activitati biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologica principala a interferonilor este cea *antivirala* si a fost demonstrata experimental. Infectiile virale sunt mult mai severe la animalele de experienta, carora, odata cu virusul infectios li s-a injectat ser imun specific anti-interferon.

Interferonii formeaza *prima linie de aparare umorala fata de infectiile virale*, înainte de mobilizarea raspunsului imun. Interferonii protejeaza celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimina complet infectia. Starea de protectie antivirala, indusa de interferoni dureaza câteva zile si apoi dispare. Dupa câteva zile de absenta, starea de protectie poate fi indusa din nou.

Interferonii nu au actiune antivirala directa, ci *induc o stare*

antivirala.

Interferonii au specificitate de specie, adica activitatile biologice si în special efectul protector antiviral se manifesta fata de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs interferonul. Baza specificitatii de actiune, rezida în interactiunea dintre interferon si receptorul celular. Activitatea biologica a interferonilor este direct proportionala cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de soarece are, *in vitro*, efect protector fata de celulele de soarece, indiferent de virusul infectant. Acelasi interferon are un efect protector minim (5%) pentru celulele de sobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protectia antivirala este dependenta de concentratia interferonilor. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, *in vitro*, sunt protectoare fata de nivelul scazut al multiplicitatii de infectie, asemanator celui natural. Multiplicitatea înalta de infectie (cea experimentala), depaseste efectul protector al interferonilor.

Descoperirea interferonilor a condus la revizuirea conceptului imunitatii celulare si a rolului sau în limitarea infectiilor virale. Sistemul interferonului este primul care îsi exercita efectul protector, dintre toate sistemele de aparare cunoscute. El este operativ în decurs de câteva ore de la infectie.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei interferonului si sunt sensibile, în diferite grade, la actiunea lui.

Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfasurarea ciclului multiplicarii virale. Este eliberat din celule imediat dupa sinteza si difuzeaza spre celulele învecinate, carora le induce starea antivirala. Astfel, virusul, în ciclul sau replicativ, întâlneste o bariera intracelulara. Nivelul activitatii antivirale, probabil, este dependent de concentratia extracelulara a interferonului, astfel ca celulele învecinate celor producatoare de interferon devin cele mai rezistente la infectia cu virus. Celulele mai îndepartate sunt mai putin protejate.

Eficienta relativa a diferitelor mecanisme de aparare, inclusiv a celui mediat de interferon depinde de ruta pe care se raspândeste virusul. De la poarta de intrare, virusul se disemineaza spre organele tinta, pe calea fluidelor organismului (sânge, limfa), prin leucocitele infectate sau pe cale axonala. Diseminarea pe cale sanguina si limfatica este limitata de macrofagele asociate capilarelor sanguine si limfatice. Viremia diminua si odata cu ea diminua severitatea infectiei. Experientele cu administrare de interferon evidentiaza ca interferonul circulant reduce viremia si protejeaza organele tinta. Interferonul este mai putin eficient fata de virusurile care se disemineaza pe cale

axonala.

La pacientii hipogamaglobulinemici, limitarea si eliminarea infectiei virale este rezultatul actiunii interferonului, a reactiei febrile a organismului, a raspunsului inflamator si a imunitatii mediate celular.

Bazele moleculare ale activitatii interferonilor

Interferonii nu au activitate biologica în celulele care îi sintetizeaza. Principala lor activitate –*cea antivirala*- nu este directa, deoarece interferonii nu sunt molecule efectoare, ci *inductori ai starii antivirale*. Interferonii actioneaza asupra celulelor neinfectate si le induc starea de rezistenta fata de infectie, influentând multiplicarea virusurilor în diferite etape ale ciclului (de exemplu, transcrierea ARNm, traducerea etc.), în functie de sistemul celular.

Dupa secretia din celulele în care a fost sintetizat, interferonul se leaga de receptorul membranar al altor celule, unde functioneaza ca o citochina paracrina si activeaza un set de gene specifice. Corespunzator celor doua tipuri de interferoni, se cunosc doua tipuri de receptori. Ambele sunt glicoproteine de membrana.

Complexele interferon-receptor sunt endocitate. Internalizarea lor declanseaza evenimentele nucleare, al caror rezultat este starea antivirala si aparitia unor modificari ale metabolismului celular.

Interferonii induc sinteza unor proteine, care mediaza efectele lor multiple. Starea antivirala este produsa pe mai multe cai. Pot fi inhibate diferite etape ale ciclului de replicare virala: penetrarea si dezvelirea, transcrierea ARNm viral, traducerea ARNm viral, replicarea genomului, asamblarea si eliberarea virusului progen. Decisiva este natura virusului, dar tipul celular poate avea un rol important. Starea antivirala este, în primul rând, consecinta sintezei în celula, a unei *proteine inhibitoare a transcrierii si/sau a traducerii mesajului genetic viral (PIT*), care interfera fie cu sinteza ARNm viral, fie cu traducerea sa, fie cu ambele procese. O a II-a cale majora a inducerii starii antivirale este degradarea ARNm viral prin actiunea *2'-5' oligo-adenilat-sintetazei si a riboendonucleazei* .

În cele mai multe sisteme virus-celula, inhibitia multiplicarii virale este rezultatul interferentei cu etapa *traducerii* ARNm viral. In celulele liniei sensibile L (originara din fibroblaste de embrion de soarece), infectate cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociaza cu ribosomii eliberati si formeaza polisomi ce sintetizeaza proteine specific virale. In celulele tratate cu interferon, înainte de infectia virala, ARNm viral nu se asociaza cu ribosomii si nu se sintetizeaza proteine specifice. In absenta proteinelor virale, infectia este abortiva. Efectul este acelasi dupa infectia cu reo-,

picorna-, toga-, rhabdo-, paramixo-, herpes- sau cu papovavirusuri.

În celulele tratate cu actinomicina D (un inhibitor specific al sintezei proteice), efectul protector al interferonului nu se realizeaza.

Una din proteinele inhibitoare ale traducerii ARNm viral este *protein-chinaza dependenta de ARN dublu catenar (PKR),* denumita si *chinaza factorului de initiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2)* .

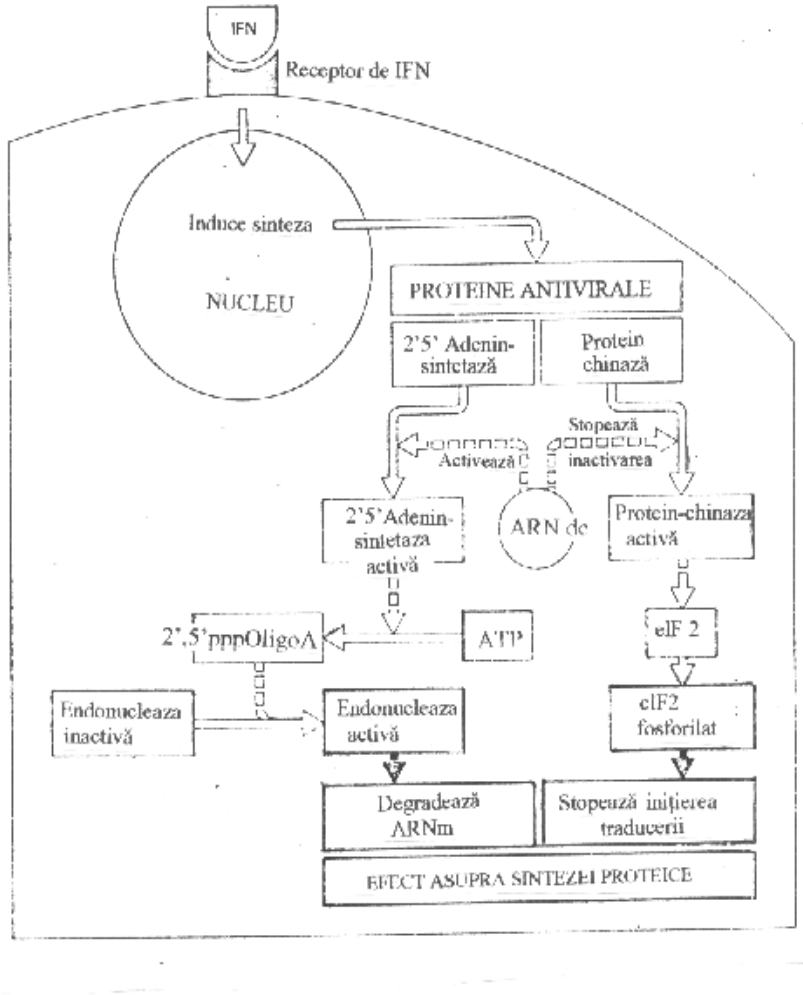


Fig. 87. Actiunile antivirale ale *interferonilor* (IFN). Interferonii se leaga specific de receptorii de IFN si produc numeroase efecte, doua dintre ele fiind ilustrate în schema. IFN induc sinteza proteinelor antivirale – 2',5' adenozin-sintetaza si o protein-chinaza. Ambele sunt activate de ARN dublu catenar, intermediarul replicarii virale. Sintetaza induce formarea 2'5'ppp-oligo A, care activeaza o endonucleaza capabila sa produca degradarea ARNm. Protein-chinaza fosforileaza factorul de initiere al traducerii proteinelor, eIF_2, pe care îl inactiveaza (dupa Male, 1987).

PKR este o chinaza serina/treonina, prezenta în celule si în mod normal se sintetizeaza cu o rata foarte scazuta. Enzima, în proportie de 20% se gaseste în nucleu (mai ales în nucleol) si 80% are sediul citoplasmatic. In cea mai mare parte, protein-chinaza citoplasmatica este legata de ribosomi si este mai fosforilata decât cea nucleara. Protein-chinaza este inactiva (latenta), dar poate fi activata de ARN dublu catenar. În celulele tratate cu interferon, nivelul protein-chinazei (o proteina de 67 kD) creste de peste 20 de ori.

PKR se activeaza în prezenta ARN dublu catenar, rezultatul fiind autofosforilarea câtorva resturi de serina si treonina. Autofosforilarea este cel mai probabil, intermoleculara si se produce între doua molecule de PKR asociate cu aceiasi molecula de ARN dublu catenar. In consecinta, concentratiile mari de ARN-dublu catenar inhiba procesul autofosforilarii. Heparina (un polianion) activeaza aceasta enzima. Substratul fiziologic unic al PKR fosforilate este subunitatea α a factorului de traducere eIF-2. eIF-2 fosforilat nu poate fi reciclat pentru initierea traducerii si produce inhibitia sintezei proteinelor celulare.

În celula infectata cu un virus, protein-chinaza, se asociaza cu ARN-dublu catenar, se activeaza si se fosforileaza. Protein-chinaza activata, poate fosforila un numar de substraturi celulare, inclusiv factorul 2 α, de initiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2 α), la restul de serina 5l (Kumar, 1998). eIF-2 α fosforilat, blocheaza initierea sintezei catenei polipeptidice.

Alta cale activata de ARN dublu catenar si de interferon este calea 2',5'-oligo-adenilat- sintetazei/RN-aza. Interferonii induc sinteza unei familii de enzime denumite 2-5(A)sintetaze, care polimerizeaza ATP în oligo-adenilati de diferite lungimi, legati 2'-5'. Aceste enzime sunt inactive, dar se activeaza datorita unei schimbari conformationale care se produce consecutiv legarii sale cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activata este capabila sa polimerizeze ATP si alte nucleotide în legaturi 2'-5'. In molecula de 2',5'-oligoadenozina, resturile de riboza sunt legate prin punti fosfo-diesterice 2'-5'. Acestea sunt legaturi unice, deoarece toate polinucleotidele naturale contin legaturi 3'-5'.

2',5'-oligoadenozina activeaza RN-aza L. RN-aza L este detectabila în toate celulele animale. Majoritatea celulelor contin o fosfodiesteraza ce poate hidroliza 2-5(A). RN-aza L poate cliva ARN celular si viral monocatenar la secvente specifice UpA, UpG si UpU. RN-aza L poate manifesta efecte antivirale prin inductia apoptozei. Aceasta cale este activa în inhibitia replicarii picornavirusurilor în celulele tratate cu IFN

Cei mai buni interferoni stimuleaza sinteza interferonilor, care la

rândul lor activeaza ambele enzime (adenilat-sintetaza si protein-kinaza).

Interferonii au actiune directa, prin inducerea modificarilor în *membrana plasmatica* a celulei, marind rigiditatea stratului lipidic. Acesta poate fi mecanismul efectului inhibitor al interferonului asupra transformarii maligne a celulelor, sub actiunea virusurilor oncogene.

Daca la nivel celular, efectele antivirale ale interferonilor sunt mediate în primul rând prin actiunea proteinelor antivirale intracelulare, în organism interferonii actioneaza prin alte mecanisme. Interferonii stimuleaza functia imunitara. Celulele infectate de virusuri sunt lizate de celulele imunitare. Recunoasterea lor este mediata de moleculele CMH I, a caror expresie este stimulata de interferoni. Interferonii sunt stimulatori ai enzimei nitric-oxid-sintetaza, care prin oxidul nitric(NO) inhiba replicarea virusurilor în anumite celule.

Alte activitati biologice ale interferonilor. Interferonii exercita o gama larga de actiuni, cu efecte inhibitoare sau stimulatoare asupra celulelor sensibile

Efectele inhibitorii se exercita nu numai asupra multiplicarii virusurilor, ci si asupra cresterii si multiplicarii microorganismelor parazite cu localizare intracelulara, asupra unor activitati metabolice tisulare (de exemplu, prin inhibitia sintezei proteice, interferonul poate sa induca procese de necroza celulara), asupra multiplicarii celulelor tumorale, asupra cresterii si diviziunii celulelor normale, asupra reactiilor de hipersensibilitate întârziata.

Efectele stimulatoare ale interferonilor se exercita asupra nivelului de exprimare a unor molecule de suprafata a celulelor (de exemplu, moleculele CMH, receptorii de mare afinitate pentru regiunea Fc a IgG pe suprafata macrofagului, cu consecinte importante pentru rata eliminarii complexelor imune prin fagocitoza si asupra ADCC).

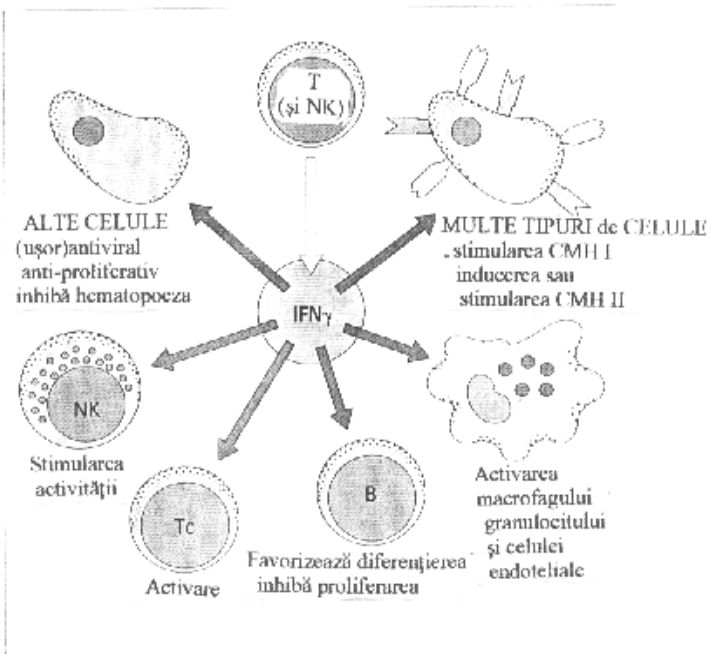


Fig. 88. Functiile IFN γ sunt multiple: activitatile antivirala si antiproliferativa sunt mai putin intense decât ale IFN α si β, dar este cel mai puternic inductor al activarii macrofagelor si al exprimarii moleculelor CMH clasa II pe celulele tisulare, fiind sinergic cu TNF α si TNF β.

Interferonii stimuleaza activitatea citotoxica a limfocitelor NK si activeaza metabolismul oxidativ al macrofagelor, precum si activitatea lor antitumorala. Pe suprafata limfocitelor T, interferonii intensifica exprimarea receptorilor pentru IL-2. Stimuleaza raspunsul imun, daca este administrat concomitent cu antigenul. Efectul imunostimulator se poate atribui unei mai bune exprimari a moleculelor CMH, ceea ce conditioneaza o prezentare mai eficienta a antigenului.

Semnificatia biologica a interferonilor. Interferonii sunt componente ale retelei citochinelor. Citochinele sunt molecule active, produse de diferite categorii de celule, sub actiunea unor stimuli, inclusiv sub actiunea interferonilor.

Citochinele interactioneaza cu receptorii altor celule si regleaza procesele lor de proliferare si diferentiere. Deoarece limfocitele stimulate produc interferon γ, aceasta clasa de molecule face parte din categoria *limfochinelor*.

Adeseori, efectele biologice ale diferitelor categorii de citochine sunt antagonice. Homeostazia celulara este, probabil, rezultatul unui

echilibru între efectele induse de o varietate de citochine.

Între interferoni si hormoni, exista câteva asemanari, cu privire la mecanismul secretiei si eliminarii din celulele producatoare, al interactiunii cu celulele sensibile, al mecanismului de actiune asupra celulelor (ca si hormonii, interferonii activeaza ciclazele GMP si AMP), precum si în ceea ce priveste efectele reglatoare si modulatoare ale celor doua categorii de molecule asupra reactiilor imunitare.

Având în vedere aceste asemanari, s-a propus ca interferonii sa faca parte din grupul hormonilor "neclasici", alaturi de *EGF* (*E*pidermal *G*rowth *F*actor), *PDGF* (*P*latelet *D*erived *G*rowth *F*actor), *NGF* (*N*erv *G*rowth *F*actor) etc.

Perspectivele producerii si utilizarii interferonilor.

În unele celule, sinteza interferonilor este indusa spontan, în absenta unui inductor detectabil. Interferonii α si γ sunt produsi de liniile celulare limfoblastice originare în celulele T, în concentratii variabile, de la l la l000 U/ml.

Interferonii sunt produsi prin *biotehnologii* moderne, în celule manipulate genetic. Genele codificatoare ale sintezei interferonilor au fost izolate, secventiate si inserate în vectori de clonare. Acestia au fost transferati în celula procariota (*E. coli*) sau eucariota. Genele codificatoare ale interferonilor sunt transcrise atât în celule bacteriene, cât si în celule eucariote. Pe aceasta cale, *in vitro* sau obtinut cantitati mari de interferoni (utilizabili în clinica), fiind sintetizati de celulele bacteriene, de levuri si de celulele de mamifere.

Interferonii se utilizeaza pe scara larga în tratamentul infectiilor cu virus rabic si cu virusuri encefalitogene. Efectul lor este ameliorarea sau chiar eliminarea infectiilor persistente, cu virusul hepatitei B, C, cu herpes-zoster sau cu citomegalovirus.

Interferonii au proprietati antiproliferative si se folosesc în tratamentul unor stari neoplazice umane. Tumorile originare în limfocitele B sau în celulele plasmocitare sunt cele mai sensibile. Cea mai eficienta activitate antiproliferativa o are interferonul α. Varietatea γ este activa în maladia Hodgkin (proliferarea maligna a macrofagelor ganglionare).

Utilizarea interferonilor în clinica este limitata de manifestarea unor efecte secundare: febra, hipotensiune, mialgie, bradicardie

Bazele celulare si moleculare ale memoriei imunitare

Raspunsul imun are trei particularitati generale: 1) *specificitatea*; 2) *diversitatea* (heterogenitatea anticorpilor); 3) *memoria*.

Memoria imunitara este caracterizata printr-un raspuns imun mai rapid si mai extins în timp. Argumentul direct este chiar timpul de latenta mai scurt al raspunsului imun secundar, explicabil prin faptul ca dupa prima expunere la antigen, rezulta o populatie mai numeroasa de celule cu receptori specifici fata de epitopii imunostimulatori. Aceste celule au parcurs deja câteva trepte ale diferentierii spre celulele producatoare de anticorpi.

Anticorpii raspunsului imun secundar au o afinitate mai mare de legare cu antigenul specific. In raspunsul imun secundar (de memorie), initial se secreta IgM, dar si alte izotipuri, în special IgG.

Memoria imunitara implica tipuri functionale specializate de limfocite T si B, denumite *celule de memorie.*

Receptorii de antigen ai limfocitelor B de memorie sunt în special molecule de IgG, iar ai limfocitelor neangajate sunt molecule de IgM si IgD. Pe suprafata altor celule de memorie s-au identificat si alti receptori: IgM si IgG, IgM si IgA, IgM si IgE. Acesti markeri asigura generarea izotipurilor corespunzatoare de imunoglobuline în raspunsul imun secundar. Limfocitele B de memorie au localizari specifice si receptorii lor de antigen prefigureaza izotipul anticorpilor secretati: limfocitele care au ca receptor de antigen molecule de IgA si IgE sunt localizate în structurile limfoide asociate mucoaselor (digestiva, respiratorie). De aceea, calea de administrare a antigenului influenteaza profund izotipul anticorpilor care se sintetizeaza, fiecare izotip având o eficienta optima ca mediatori ai functiilor efectoare particulare: IgA inhiba aderenta microorganismelor la suprafata mucoaselor; IgG si IgM sunt efectorii raspunsului imun humoral, iar IgE activeaza mastocitele.

Receptorii de antigen ai limfocitelor B de memorie au *afinitate* mai mare de legare a antigenelor si de aceea sunt mai eficienti în captarea cantitatilor mici de antigene si în prezentarea mai rapida a acestora.

Mecanismul generarii limfocitelor B de memorie este ipotetic. Una din teorii considera ca atât plasmocitele (producatoare de anticorpi) cât si celulele B de memorie deriva din *acelasi limfocit B precursor*. Celulele rezultate din diviziunile succesive declansate de stimularea antigenica evolueaza diferit: unele se diferentiaza în plasmocite, iar altele ramân limfocite mici care se reîntorc la starea G_0 si devin limfocite de memorie. Descendentii clonei stimulate evolueaza spre plasmocit sau

spre celula de memorie, în raport cu influentele pe care le primeste de la diferite limfochine, de la celulele accesorii sau de la celulele Th.

Dupa alta teorie, celulele de memorie si plasmocitele provin din *celule B diferite*. Limfocitele B par fi preprogramate sa devina plasmocite sau limfocite de memorie, înainte de expunerea la antigen.

Raspunsul imun secundar se caracterizeaza prin cresterea afinitatii anticorpilor.

Afinitatea receptorilor si a anticorpilor fata de antigene este conferita de regiunea variabila a moleculei. Cresterea afinitatii este explicabila prin doua mecanisme:

– *stimularea selectiva a limfocitelor* care au receptor VH/VL de mare afinitate, exprimat pe suprafata limfocitelor B neangajate. Altfel spus, pe masura ce cantitatea de antigen scade, continua sa se activeze numai celulele cu receptori de mare afinitate si sa domine raspunsul imun;

– dupa stimularea antigenica, în centrii germinativi ai organelor limfoide secundare are loc procesul *hipermutatiei somatice*, printr-un mecanism necunoscut ce introduce mutatii punctiforme în regiunile V.

Mecanismul memoriei imunologice pentru *perioade lungi de timp* (luni, ani sau tot restul vietii) nu este cunoscut. Populatia celulelor de memorie trebuie, prin definitie, sa aiba viata lunga si aceasta, teoretic, se poate realiza fie prin generarea celulelor care nu se divid si nu mor sau prin generarea unei populatii care se reînoieste prin diviziuni care înlocuiesc celulele moarte. Primul model are avantajul ca nu necesita un component reglator, iar al II-lea impune actiunea unui mecanism reglator al ratei de reînoire.

Existenta unor limfocite cu viata lunga, dupa unii autori, este cu totul improbabila, dar rezultatele analizei limfocitelor la om, dupa expunerea severa la radiatii, sugereaza ca celulele individuale pot sa persiste fara sa se divida, un interval de ordinul câtorva decade. Dupa alte opinii, supravietuirea limfocitelor T si B este dependenta de prezenta antigenului. Experientele de transfer adoptiv al celulelor de memorie (T si B) au aratat o scadere a raspunsului de memorie, în 30-40 de zile, ceea ce sugereaza ca memoria imunitara nu este rezultatul diferentierii limfocitelor de memorie cu viata lunga. Pastrarea antigenului în organism pare sa aiba rol esential în mentinerea tuturor categoriilor de celule de memorie.

Antigenul se depoziteaza si se pastreaza în organism pentru perioade de ordinul lunilor sau chiar un an, în asociatie cu *celulele foliculare dendritice*, *sub forma complexelor imune*. Ele realizeaza stimularea continua a limfocitelor B, la un nivel scazut. Celulele foliculare dendritice sunt esentiale pentru memoria imunitara a celulelor

B, a caror stimulare de durata o realizeaza cu antigenele pe care le poarta pe suprafata lor. Celulele foliculare dendritice nu prelucreaza si nu prezinta antigenele, dar depoziteaza complexele antigen-anticorp pe suprafata lor.

O alta modalitate a pastrarii îndelungate a memoriei imunitare este consecinta *expunerii periodice a limfocitelor B la antigene* cu reactie încrucisata, la superantigene sau la mitogene, care prin intermediul interleuchinelor determina o expansiune limitata la câteva cicluri de diviziune.

Reteaua idiotipica a lui Jerne explica memoria imunitara: interactiunile idiotipice dintre diferitii constituienti moleculari si celulari ai retelei, initiate de contactul cu antigenul, ar fi suficiente pentru pastrarea memoriei informatiei antigenice dobândita anterior.

Limfocitele B de memorie nu se activeaza sub actiunea mitogenilor sau a activatorilor policlonali, ci raspund numai la antigenul specific. Activarea lor necesita o cantitate mult mai mica de antigen si este mult mai putin T-dependenta.

Celulele Th de memorie sunt probabil generate în cortexul ganglionilor limfatici, dar mecanismul nu este cunoscut. Mecanismul memoriei celulelor T a fost propus dupa modelul inducerii dermatitei de contact, o reactie de hipersensibilitate întârziata, mediata de celulele CD_4.

Din punct de vedere functional, în contrast cu celulele Th neangajate, celulele Th de memorie primesc informatie antigenica nu numai de la macrofag, ci si de la limfocitele B localizate la interfata dintre foliculi si cortexul ganglionilor limfatici. Cele neangajate stimuleaza slab celulele B, iar celulele CD_4 de memorie mediaza raspunsul viguros al limfocitelor B.

Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT) nu sufera fenomenul maturarii de afinitate. Aceasta înseamna ca limfocitele T de memorie nu leaga epitopii antigenici cu afinitate mai mare, dar dupa stimularea secundara, ele *se activeaza mai rapid*. Coreceptorul CD_{45} este prezent într-o izoforma cu greutate moleculara mai mica decât al limfocitelor T CD_4 neangajate.

Caracteristica functionala definitorie a celulelor Th de memorie este raspunsul lor mult mai amplu la stimulul antigenic, prin proliferare intensa, comparativ cu celulele neangajate. Dupa stimulare, celulele Th de memorie produc o gama mult mai larga de limfochine: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ, spre deosebire de limfocitele Th neangajate, care la contactul cu antigenul sintetizeaza IL-2.

Mecanismul molecular al generarii *limfocitelor Tc* (CTL) de

memorie nu este cunoscut. Raspunsul imun mediat celular fata de antigenele de transplantare si fata de antigenele celulare în general, are la baza aceleasi caracteristici ale reactivitatii imunitare: instalarea memoriei imunitare dupa stimulul primar si o reactivitate intensa si rapida dupa reexpunerea la antigen. Reactivitatea imuna secundara mediata celular se evidentiaza în dinamica respingerii alo- si xenografelor: organismele liniei genetice A resping alografa primara de la linia inbred B dupa dinamica raspunsului imun primar (10-14 zile). A II-a grefa de tesut de aceiasi provenienta este respinsa dupa dinamica raspunsului imun secundar (5-6 zile), iar a II-a grefa de la un organism al liniei inbred C este respinsa de organismele liniei A dupa dinamica raspunsului imun primar.

Celulele T CD_8 de memorie produc o gama larga de citochine, iar cele neangajate produc IFN γ.

Raspunsul imun secundar (de memorie) este rezultatul cooperarii variatelor tipuri de celule de memorie. De exemplu, celulele Th de memorie produc IL-2, cu efect stimulator asupra celulelor Tc si B de memorie. Cooperarea celulara mareste eficienta raspunsului imun. O cooperare de tip special este aceea a limfocitelor B de memorie, care au capacitatea de a capta foarte eficient cantitatile foarte mici de antigene specifice si de a le prezenta limfocitelor Th. Captarea antigenului prin intermediul receptorului imunoglobulinic specific de antigen este de circa 1000 de ori mai eficienta decât prin pinocitoza nespecifica.

Pe suprafata limfocitelor T de memorie nu apar molecule noi, dar se exprima la un nivel superior, cele implicate în aderenta la epiteliul venulelor. Moleculele de suprafata sunt implicate în recircularea limfocitelor la situsuri preferentiale (homing). Celulele T de memorie recircula în primul rând în tesuturile nelimfoide, ajung în tesuturile limfoide prin limfaticele aferente si se reîntorc în sânge prin limfa eferenta. Dovada este adusa de faptul ca *in vivo*, celulele care intra cu limfa în ganglionii limfatici, sunt exclusiv celule de memorie. Nu se stie daca aceste celule recircula sau raspund la o stimulare antigenica.

În concluzie, cele mai ample diferente între celulele neangajate si cele de memorie sunt de ordin functional si constau în primul rând în capacitatea celulelor de memorie de a secreta o gama foarte larga de citochine. Populatia celulelor de memorie are viata lunga, dar se pot divide cu o rata controlata de mecanisme homeostatice. Conditiile pentru generarea si mentinerea memoriei nu sunt clare. Reexpunerea la antigenul specific nu pare a fi necesara pentru pastrarea memoriei.

REGLAREA RASPUNSULUI IMUN

Pentru eficienta actiunii nu este suficient sa posezi efectori foarte buni, ci performantele efectorilor trebuie monitorizate….(N. Wiener, 1961).

Teoria selectiei clonale considera ca organismul animal sau uman, în mod obisnuit raspunde la stimularea cu orice substanta antigenica naturala sau artificiala, deoarece sistemul imunitar este alcatuit dintr-un numar imens de populatii de celule limfoide, fiecare având receptori specifici pentru un epitop antigenic.

Sistemul imunitar manifesta o stare de toleranta perfecta fata de constituientii proprii organismului, dar exista situatii de exceptie, în care anumite molecule self pot deveni imunogene.

Interactiunile reciproce ale retelei idiotipice, ca mecanism esential al reglarii raspunsului imun, se bazeaza pe rationamentul ca dupa stimularea antigenica, raspunsul imun evolueaza pe doua directii esentiale:

– sinteza anticorpilor complementari fata de antigenul inductor, efectul fiind legarea si neutralizarea antigenului;

– sinteza unor molecule care se combina specific cu moleculele de imunoglobuline libere, dar si cu receptorii limfocitelor T si B si îi blocheaza, inhibând functia lor si stopând raspunsul imun. Aceste molecule au rol esential în reglarea raspunsului imun.

Sinteza moleculelor cu actiune specifica fata de receptorii limfocitari se datoreaza faptului ca moleculele de imunoglubuline, libere sau legate de celule, au determinanti antigenici proprii care se comporta ca imunogene chiar pentru organismul în care s-au sintetizat.

Determinanti antigenici izotipici. Molecula de imunoglobulina poarta în structura sa mai multe categorii de determinanti antigenici, evidentiati prin injectarea imunoglobulinei asociata cu adjuvantul Freund, la animalele de laborator. Anticorpii se comporta ca *antigene* fata de organismele altor specii si se sintetizeaza anticorpi fata de determinantii antigenici care definesc variantele izotipice, caracteristici diferitelor clase de imunoglobuline. Determinantii antigenici izotipici se gasesc pe catena H (γ, μ, α, δ, ε) sau pe catena L (κ sau λ) si sunt invarianti pe toate moleculele de imunoglobuline ale unei clase, la toti indivizii unei specii.

Determinantii alotipici se gasesc pe moleculele de imunoglobuline ale organismelor unei specii, care au acelasi alotip, adica aceiasi combinatie de gene alele codificatoare ale anticorpilor. Determinantii alotipici sunt localizati în regiunile constante ale catenelor H si L si semnificatia lor este analoga celei a antigenelor de grup sanguin.

Determinantii idiotipici sunt localizati în regiunile variabile ale moleculei de imunoglobulina si reflecta particularitatile biochimice ale acestei regiuni. Aici se gasesc determinantii antigenici cu caracter individual ai moleculei de imunoglobulina, denumiti *idiotopi*, consecinta a hipervariabilitatii aminoacizilor.

Fiecare determinant antigenic se numeste *idiotop*, iar ansamblul lor formeaza *idiotipul*. Idiotopii sunt asociati cu secventele hipervariabile ale moleculei: trei secvente ale catenei L si trei din cele patru secvente hipervariabile ale catenei H (secventa a 3-a nu intra în alcatuirea paratopului).

Fenomenul idiotipiei semnifica existenta unor determinanti proprii fiecarui organism, localizati pe moleculele de anticorpi. Prezenta idiotopilor nu este limitata la moleculele libere de imunoglobuline, ci se gasesc si în structura receptorilor limfocitari de antigen, în special în structura moleculelor de imunoglobuline cu rol de receptor de antigen de pe suprafata limfocitelor B.

Teoria retelei idiotipice considera ca idiotopii sunt imunogeni chiar pentru organismul în care s-au sintetizat si induc sinteza anticorpilor specifici cu care se combina. Acestia se numesc anticorpi *anti-idiotipici*. La rândul lor, anticorpii anti-idiotipici induc sinteza anticorpilor *anti-anti-idiotipici.* Astfel, reteaua idiotipica nu este numai o retea de interactiuni moleculare între imunoglobulinele libere, ci este o retea mixta de *interactiuni celulare si moleculare*.

În contextul teoriei, distinctia dintre idiotip si anti-idiotip este numai operationala. Orice idiotip de pe suprafata unui receptor de antigen(molecula libera sau ancorata în membrana limfocitelor T si B) poate functiona simultan, ca *imunogen*(epitop) stimulator al raspunsului imun, dar functioneaza si ca *paratop*, capabil sa se lege cu idiotipul complementar.

Repertoriul idiotipurilor este egal cu acela al specificitatilor de legare.

Teoria retelei idiotipice a lui Jerne se bazeaza pe faptul ca într-un organism, fiecare molecula de anticorp este recunoscuta de situsurile de combinare ale altor molecule de anticorpi cu configuratie spatiala complementara. Astfel, idiotopii proprii anticorpilor sintetizati în faza initiala a raspunsului imun, se comporta ca determinanti antigenici si declanseaza un raspuns imun de faza II-a, în care se sintetizeaza anticorpi anti-anticorpi din faza I-a a raspunsului imun. Anticorpii din faza a II-a se numesc *anticorpi anti-idiotip*. La rândul lor, acestia au un set propriu de idiotopi, care se comporta ca epitopi antigenici si induc sinteza anticorpilor de faza a III-a s.a.m.d. Ca într-o sala a oglinzilor, acest proces se poate repeta continuu. Anticorpii sintetizati într-o astfel de cascada a raspunsului imun, sunt legati într-o retea de interactiuni specifice, care poate sa implice întregul sistem imunitar.

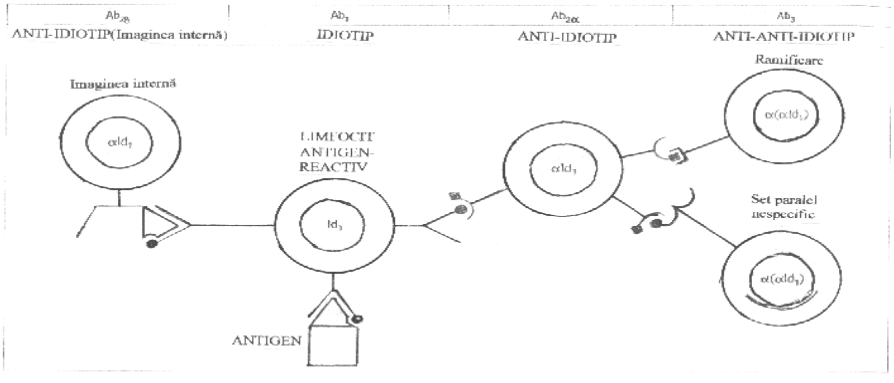


Fig. 89. Elementele *retelei idiotipice*, în care receptorii de antigen ai unui limfocit recunosc reciproc un idiotip pe receptorii altui limfocit. Limfocitele Th, Ts si B interactioneaza prin reactii idiotip-antiidiotip, producând stimularea sau supresia. Interactiunile T-T pot avea loc prin recunoasterea directa a unui RCT de catre altul sau mai frecvent, prin recunoasterea unui peptid RCT prelucrat si asociat cu moleculele CMH. Unul din seturile de anticorpi antiidiotipici, $Ab_{2\beta}$ poate purta un idiotip asemanator cu antigenul (adica este imaginea interna a acestuia). Acelasi idiotip (O) poate fi prezent pe receptorii cu specificitati distincte, astfel ca anti-(anti-Id_1) nu se leaga în mod necesar de antigenul original (α = anti; Id = Idiotip; Ab_1 = Id; $Ab_{2\alpha}$ = anti-Idiotip ce nu implica paratopul; Ab_2 β = anticorpi anti-Idiotip imaginea interna care implica paratopul; Ab_3 = anti(anti-Id).

Anticorpii anti-idiotipici constituie forta reglatoare a sistemului imunitar.

În mod asemanator, reteaua de interactiuni specifice se creeaza între idiotopii moleculelor receptoare de antigen din membrana limfocitelor T. Ei sunt recunoscuti de situsurile de combinare ale receptorilor de pe un alt set de limfocite.

Teoria retelei idiotipice se bazeaza pe existenta unei retele imense de interactiuni idiotip-antiidiotip, atât între anticorpi cât si între receptorii celulari, ce asigura controlul raspunsului imun.

Dupa Jerne, interactiunile retelei se produc nu numai ca raspuns la un stimul antigenic, ci si în *starea de echilibru* a sistemului imunitar.

Caracterul de retea a sistemului imunitar decurge din faptul ca fiecare molecula de anticorp sau de receptor, functioneaza mai întâi ca molecula efectoare a raspunsului imun, dar si ca molecula inductoare a sintezei altor efectori. Prin intermediul interactiunilor idiotip-antiidiotip, *sistemul imunitar interactioneaza cu el însusi*.

În *absenta* stimulilor antigenici, sistemul imunitar este în *stare de echilibru* (steady state) si reteaua idiotipica functioneaza unitar. Interactiunile retelei activeaza limfocitele B si ele sintetizeaza mici

cantitati de anticorpi. Astfel, sistemul imunitar este concentrat asupra componentelor proprii si produce anticorpi-antiidiotipici fata de propriul sau repertoriu de receptori. Toate componentele retelei imunitare(celule, molecule) sunt într-o stare de comunicare permanenta si în stare de *echilibru reciproc*. Consecinta interactiunilor reciproce inductoare idiotip-antiidiotip este starea normala (echilibrata), represata, a sistemului imunitar.

Patrunderea unui antigen exogen în organism, stimuleaza câteva clone de limfocite si astfel sistemul imunitar iese din starea de represie obisnuita. Se sintetizeaza Ac_1, care au idiotipul 1(I_1).

Ca raspuns la determinantii idiotipici ai idiotipului 1, limfocitele B sintetizeaza anticorpi de faza a II-a (anticorpi anti-idiotip I_1). Efectele declansate de un antigen se propaga în tot sistemul imunitar, asa cum pe suprafata unei ape, sub impactul unui soc mecanic se induc unde succesive tot mai mici, pâna se ajunge la starea de echilibru.

Teoria retelei idiotipice introduce un concept nou – al imaginii *interne a antigenului*, foarte important din punct de vedere teoretic si practic. In acord cu aceasta conceptie, anticorpii (Ac_1) fata de un epitop poarta imaginea sa negativa. Idiotopii acestor molecule, asociati situsului de combinare, induc sinteza anticorpilor anti-idiotipici (Ac_2). Acestia poarta imaginea negativa a anticorpilor 1 si vor reproduce imaginea interna a epitopului initial. Anticorpii 2, care sunt imaginea interna a antigenului, pot fi stimulatori ai raspunsului imun fata de antigenul initial.

Numarul imaginilor interne creste odata cu sinteza unui nou idiotip, pe masura ce influenta antigenului se propaga în reteaua sistemului imunitar.

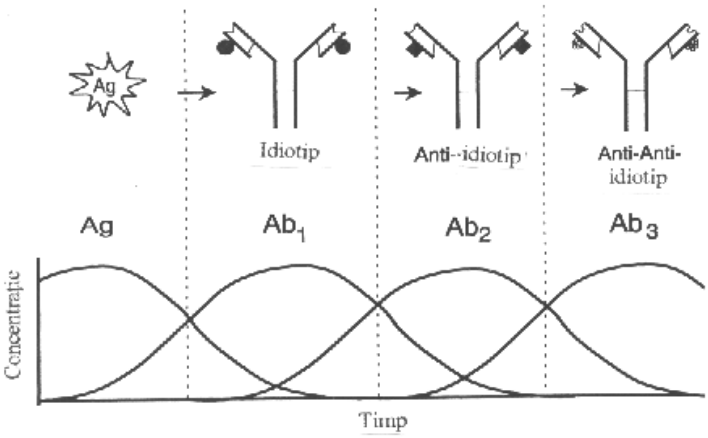


Fig. 90. Ilustrarea grafica a *retelei idiotipice*. Anticorpii generati ca raspuns fata de un antigen constituie primul val al raspunsului. Al II-lea val este initiat de idiotipul anticorpilor din primul val si se numesc *anticorpi anti-idiotipici*. Ei exprima idiotipul care genereaza al III-lea val al raspunsului anticorpilor (*anticorpi anti-anti-idiotipici*). Teoria considera ca raspunsul idiotip-anti-idiotip continua indefinit, însa circuitul se încheie când unul din idiotipurile anticorpilor se aseamana cu unul din idiotipurile sintetizate într-un val anterior.

Conceptia actuala a functionalitatii sistemului imunitar presupune ca acesta este format dintr-un numar mare de *clone de limfocite*, care poarta receptori preformati fata de antigene. In acord cu reteaua idiotipica, imaginile interne ale diferitilor epitopi ai clonelor de limfocite, sunt prezente în retea, asa încât nici un epitop din mediul extern nu este cu adevarat strain pentru sistemul imunitar, deoarece toti epitopii capabili sa induca un raspuns imun, sunt reprezentati în sistemul imunitar de receptori limfocitari, prin imaginea lor interna.

Unii idiotopi ai retelei sunt chiar imaginea interna a moleculelor antigenice din propriul organism. In acord cu aceasta conceptie, maladiile autoimune sunt consecinta perturbarii retelei idiotipice.

Reteaua idiotipica se stimuleaza si sintetizeaza anticorpi anti-idiotipici, numai când idiotopii ating o concentratie limita.

Jerne compara cascada activarii idiotip-antiidiotip a sistemului imunitar, cu o sala a oglinzilor, în care initial se formeaza imaginea negativa a structurii nonself (anti-nonself), apoi anti-anti-nonself, care la rândul lor reflecta universul antigenelor exogene.

Teoria retelei idiotipice permite întelegerea sistemului imunitar ca un sistem global de *interactiuni reciproce*, în contradictie cu teoria clasica a clonelor de limfocite care asteapta pasiv întâlnirea cu antigenul.

Elementul fundamental al teoriei este ca sistemul imunitar formeaza o retea functionala de interactiuni între molecule de anticorpi si receptorii limfocitari, continuu echilibrata înainte de patrunderea antigenului exogen.

Interactiunile idiotipice sugereaza o legatura functionala permanenta între limfocite, precum si între limfocite si alte categorii de celule din organism, stimulând pe unele, represând pe altele, printr-un ansamblu de semnale interne

Toleranta imunitara

Toleranta este o stare fiziologica, caracterizata prin absenta raspunsului imun fata de un antigen si prin pastrarea capacitatii de raspuns imun fata de alte antigene.

Sistemul imunitar este tolerant, în primul rând fata de componentele self, pe care a învatat sa le recunoasca în timpul dezvoltarii embrionare.

Starea de toleranta este specifica pentru un antigen dat si pentru cele înrudite din punct de vedere chimic, dar este asociata cu pastrarea reactivitatii imunitare fata de toate antigenele care nu dau reactie încrucisata cu antigenul tolerat.

Toleranta imunitara si reactivitatea imunitara prezinta urmatoarele caracteristici comune:

- sunt specifice fata de un antigen dat
- se manifesta dupa contactul cu antigenul inductor
- sunt mediate de limfocite.

Toleranta se deosebeste de starea de *imunosupresie*, ultima fiind consecinta unei incapacitati congenitale sau dobândite de a raspunde la o varietate de antigene.

Importanta fenomenului de toleranta fata de componentele proprii organismului a fost recunoscuta de Ehrlich si Morgenroth (1900), care au formulat conceptul “horror autotoxicus”, o consecinta esentiala a functiei normale a sistemului imunitar, ce semnifica faptul ca în mod normal, organismul îsi asigura protectia propriilor sale componente fata de autodistrugerea prin reactivitatea imunitara.

Starea de toleranta poate fi indusa natural sau experimental.

Dupa 1920 s-a evidentiat ca toleranta poate fi indusa experimental, fata de unele antigene administrate în doze mari: toxina difterica, polizaharidul de streptococ (la soarece), γ globulina de cal (la iepure). Aceleasi antigene, în doze mici sunt stimulatoare ale raspunsului imun.

În 1938, Traub a indus toleranta specifica, prin inocularea soarecilor *in utero*, cu virusul coriomeningitei limfocitare (LCMV).

În 1945, Owen a evidentiat ca gemenii dizigoti de bovide (apartinând unor alotipuri diferite) îsi tolereaza reciproc antigenele tisulare, daca în cursul vietii embrionare, un proces de fuziune placentara a permis un schimb reciproc de elemente figurate. Cei doi gemeni resping grefele de tesut de origine parentala sau de la organisme cu aceiasi ascendenta. Acesti gemeni au elemente figurate

sanguine proprii, dar si celule sanguine ale gemenului cu un alotip diferit si se numesc *himere hematopoetice*.

Concluzia a fost ca, prin contactul timpuriu, în cursul vietii embrionare, al limfocitelor cu antigenele, se creeaza o stare de toleranta specifica fata de nonself si ulterior, antigenele inductoare ale tolerantei vor fi recunoscute ca self si tolerate.

Himerele hematopoetice pot fi obtinute artificial, la organismele adulte, prin iradiere sau prin imunosupresie severa medicamentoasa, urmata de injectarea celulelor de maduva osoasa straina. In clinica, pentru tratamentul unor malignitati ale sângelui se realizeaza eliminarea totala a maduvei hematopoetice prin iradiere si imunosupresie, urmata de transplantul de maduva osoasa umana.

În sens mai larg, *himera biologica* este un organism dotat în mod artificial cu componente celulare, cu tesuturi sau organe, care provin de la alt organism.

În 1953, Billingham, Brent si Medawar au descoperit faptul ca maturarea limfocitelor parcurge un stadiu, în cursul caruia contactul cu antigenul, perturba acest proces, consecinta fiind pierderea functiei imunitare, adica limfocitele devin tolerante fata de antigenul respectiv.

Starea de toleranta se induce experimental, la soarecii nou-nascuti, fata de toate tipurile de antigene. Revelatoare în acest sens sunt starile de toleranta, induse la animalele nou-nascute, fata de celulele provenite de la organisme genetic diferite. Animalele injectate la nastere cu celule alogenice, la vârsta adulta vor accepta grefele tisulare de la organismele donoare de celule.

Inducerea starii de toleranta, prin contactul timpuriu cu antigenul, înainte de nastere sau imediat dupa aceea, se datoreaza faptului ca, în stadiul embrionar si o perioada postnatala de durata variabila în functie de specie, sistemul imunitar este imatur si în consecinta, foarte sensibil la inducerea starii de toleranta imunitara.

Starea de toleranta este *specifica* fata de determinantul antigenic. Toleranta poate fi încrucisata, adica se manifesta concomitent fata de mai multe antigene diferite, înrudite chimic, daca au cel putin un determinant antigenic comun.

Limfocitele B imature sunt foarte sensibile la inducerea starii de toleranta, datorita faptului ca uneori, ele preiau informatia antigenica prin contactul direct cu epitopii specifici ai antigenului, dar dupa maturare devin rezistente la acest proces. Sensibilitatea limfocitelor T fata de inducerea tolerantei variaza în limite mai restrânse în cursul ontogeniei lor.

Mecanismele celulare si moleculare ale tolerantei sunt ipotetice, dar probabil sunt dependente de momentul inducerii tolerantei, în cursul ontogeniei lor.

Toleranta indusa în cursul vietii fetale este rezultatul contactului limfocitelor antigen-reactive, cu antigenul. Capacitatea de raspuns imun la stimulul antigenic specific este pierduta definitiv si ireversibil (de exemplu, toleranta soarecelui fata de LCMV dupa inocularea *in utero*).

În cursul vietii fetale, toleranta se instaleaza dupa acelasi mecanism al tolerantei fata de componentele self, care este putin cunoscut.

Starea de toleranta a limfocitelor B mature este mai greu inductibila. Mecanismul tolerantei este ipotetic.

În cursul vietii adulte, dupa stimularea repetata cu un Ag timo-dependent, toleranta se instaleaza ca rezultat al *epuizarii limfocitelor B antigen-reactive*. Toate limfocitele B mature, capabile sa reactioneze specific fata de un antigen, sunt stimulate si se diferentiaza în celule producatoare de Ac, astfel încât o stimulare ulterioara cu acelasi antigen ramâne fara raspuns.

Toleranta imunitara poate fi mediata de *celulele Ts*. Acest mecanism a fost demonstrat experimental la soarece, dupa injectarea unei cantitati mari de hematii de berbec. Starea de toleranta este transferabila la organisme izogenice, prin intermediul limfocitelor splenice Ts.

Toleranta poate fi indusa de *factori blocanti din plasma,* a caror natura nu este totdeauna cunoscuta, dar uneori s-au identificat a fi anticorpi, care îndeplinesc functia de specificitate, dar nu si functiile biologice efectoare.

Uneori, starea de toleranta indusa de antigenele greu degradabile este *aparenta*, deoarece se sintetizeaza anticorpi specifici fata de antigenul injectat. Se formeaza complexe imune cu antigenul care persista în organism si de aceea, în ser nu se detecteaza anticorpi liberi prin metodele obisnuite.

Factorii care conditioneaza inducerea starii de toleranta

Inducerea starii de toleranta este dependenta de doza de antigen, de modul de administrare, de starea fizica a antigenului, de calea de administrare, de rata de catabolizare a antigenului, de vârsta, de factori genetici.

Dozele inductoare ale raspunsului imun si ale tolerantei variaza mult de la un organism la altul, dar adeseori, dozele foarte mici si foarte

mari induc starea de toleranta, iar dozele medii sunt inductoare ale raspunsului imun. De exemplu, albumina serica bovina, în doze mici (1 mg/kg corp, de 3 ori pe saptamâna, timp de câteva saptamâni) sau în doza mare (100 mg/kg corp) induce starea de toleranta.

Administrarea antigenelor fara adjuvant favorizeaza instalarea tolerantei imunitare.

Administrarea intravenoasa si chiar orala favorizeaza inducerea tolerantei, iar injectarea subcutana, intradermica sau intramusculara stimuleaza raspusul imun.

Starea fizica a antigenului influenteaza reactivitatea imunitara. Antigenele proteice în stare agregata sunt imunogene, iar forma monomerica (solubila) a acelorasi antigene este, în functie de doza, imunogena sau tolerogena. Dozele mari de antigene solubile favorizeaza toleranta, dar în asociatie cu adjuvantii sunt imunogene.

Pentru inducerea si mentinerea starii de toleranta este necesara persistenta antigenului în organism. Antigenele care se catabolizeaza greu induc starea de toleranta.

Cea mai cunoscuta stare de toleranta experimentala este cea indusa de dozele mari de polizaharide (antigene timo-independente, greu degradabile). Ele produc paralizia limfocitelor B, dupa legarea în exces de receptorii lor. Corespondentul clinic al acestei situatii experimentale este starea de toleranta indusa de microorganismele capsulate, care produc infectii pulmonare la persoanele vârstnice. Pe fondul reactivitatii imunitare scazute, tesutul pulmonar este inundat cu polizaharide capsulare si sfârsitul este letal.

Durata starii de toleranta este variabila, în functie de mecanismul celular care a mediat instalarea ei.

Toleranta indusa în timpul vietii embrionare, probabil ca rezultat al anularii reactivitatii clonei de limfocite specfifice, este *ireversibila*. Toleranta indusa dupa maturarea limfocitelor este o stare reversibila si revenirea la starea imunoreactiva normala este dependenta de timpul necesar regenerarii limfocitelor mature imunoreactive.

Durata tolerantei indusa prin fenomenul “inundatiei” antigenice este dependenta de rata catabolizarii Ag.

Toleranta fatului

Pentru organismul matern, fatul este o alografa, deoarece jumatate din zestrea sa genetica este de origine paterna.

Din punct de vedere imunologic, organismul matern nu este

tolerant fata de antigenele fetale. Ca dovada, grefa de tesut fetal este respinsa.

Pe toata durata sarcinii, organismul matern îsi pastreaza reactivitatea imunitara normala, dar prin intermediul placentei, fatul dispune de un sistem eficient de protectie.

Placenta, anexa de origine embrionara, este o bariera care neutralizeaza efectorii imunitari ai organismului matern. Trofoblastul este învelisul celular al placentei si al al membranelor extraembrionare ce acopera fatul si reprezinta tesutul fetal de interfata cu sângele matern si cu tesutul endometrului. La om, stratul trofoblastic extern al vilozitatilor corionului placentar este *sincitiotrofoblastul*, un strat celular continuu fara jonctiuni intercelulare. Prin sincitiotrofoblast, fatul se hraneste, respira si supravietuieste.

Pe fata interna (spre embrion), placenta nu exprima antigenele majore de histompatibilitate, iar pe fata externa predomina antigenele minore. Moleculele CMH de origine fetala au o densitate mica. Organismul matern recunoaste antigenele fetale ale placentei si reactioneaza prin mecanisme imunitare. Asa se explica faptul ca în circulatia materna se detecteaza anticorpi antifetali la circa 15% dintre gravide. Diferentele antigenice dintre mama si fat par a fi chiar benefice pentru dezvoltarea fatului. Asa se explica vigoarea hibrizilor, în contrast cu dificultatile de propagare a liniilor inbred. Greutatea placentei si a embrionului este mai mare la femelele alogenice, fata de cele singenice în raport cu fatul lor.

Pe fondul unei reactivitati imunitare normale a organismului matern fata de stimulii antigenici, la nivelul placentei, ca zona de interfata feto-materna, se produce o modelare a reactivitatii imunitare, care favorizeaza toleranta fata de antigenele fetale.

Toleranta fata de antigenele fetale se realizeaza prin urmatoarele mecanisme:

– în placenta se secreta si se concentreaza substante cu actiune imunosupresoare strict localizata, care inhiba activarea limfocitelor Tc si NK;

– placenta secreta factori care neutralizeaza local Ac antiplacenta si îi transforma în anticorpi blocanti, care la rândul lor au efect protector;

– în placenta s-au detectat limfocite cu efect imunosupresor (Ts), iar numarul lor creste semnificativ în a II-a jumatate a sarcinii;

– placenta are o rezistenta deosebita. Celulele sale rezista efectului litic al celulelor Tc siNK;

– placenta are o capacitate proprie de regenerare. Eventualele sale leziuni provocate de efectorii IMC si IMH sunt compensate prin

proliferarea celulelor rezistente. Placenta supusa atacului efectorilor imunitari este mai groasa decât în mod obisnuit;

– placenta are rolul de a minimaliza recunoasterea antigenelor fetale de catre efectorii imunitari de origine materna, având rolul unui ”burete” imunitar. Sincitiotrofoblastul uman, dar si al altor specii, prezinta receptori pentru regiunea Fc γ, prin intermediul carora IgG matern este transportat selectiv în circulatia fetala si confera imunitate pasiva tranzitorie postnatala într-un mediu ostil din punct de vedere antigenic. Transferul maxim are loc în saptamânile 20-22 de sarcina. Concomitent pot fi transferati anticorpi materni specifici fata de antigenele fetale (în special anticorpi anti-HLA, care s-au sintetizat într-o sarcina anterioara) si care ar avea efect defavorabil asupra dezvoltarii fetale, daca ar penetra bariera placentara. Exista mecanisme care protejeaza fatul de IgG matern. Alo-anticorpii materni specifici anti-HLA fetale sunt legati pe celulele netrofoblastice (fibroblaste, endoteliale etc.) din mezenchimul intravilar al tesutului placentar si nu ajung în circulatia fetala. IgG matern cu potential lezional (IgG anti D sau anti-plachetari), care scapa efectului neutralizant al placentei întâlnesc tinte antigenice foarte extinse (pe eritrocite, pe plachete);

– sub aspect imunitar, placenta este “o zona neutra”, datorita nivelului scazut al moleculelor CMH;

Daca toate aceste bariere de aparare sunt depasite, se produce avortul imunitar.

Capitolul 6

SURSE DE GAMAGLOBULINE OMOGENE

Moleculele de anticorpi ale unui ser imun sunt foarte heterogene din punctul de vedere al specificitatii lor de combinare cu epitopii antigenici inductori, deoarece, atât antigenele moleculare, dar în special cele corpusculare (virusuri, celule), prezinta o mare diversitate de epitopi. Chiar si antigenele moleculare cele mai simple sunt mozaicuri de epitopi. Specificitatea de combinare a moleculelor de anticorpi corespunde epitopilor fata de care s-au sintetizat.

Diversitatea uriasa a specificitatii de combinare a anticorpilor (evaluata la 10^8-10^9) genereaza o heterogenitate *biochimica* de acelasi nivel, materializata în variatia secventei de aminoacizi, ceea ce a constituit un obstacol major în calea studiului lor prin metode analitice, desi anticorpii se gasesc totdeauna în sânge, cu exceptia cazurilor patologice de *agamaglobulinemie.*

Analiza biochimica a imunoglobulinelor a fost conditionata de existenta unei surse omogene de molecule de anticorpi, cu o secventa identica a aminoacizilor. Conditia identitatii secventei de aminoacizi este îndeplinita de anticorpii care au aceiasi specificitate de legare, nu fata de un antigen, ci fata de un singur epitop.

Proteinele de mielom

Sursa naturala de molecule de imunoglobulina, omogene, identice din punct de vedere biochimic (monoclonale), este *mielomul multiplu* (plasmocitomul), o afectiune tumorala maligna, initiata în maduva osoasa si rezultata prin proliferarea unui *plasmablast*.

Plasmocitomul produce molecule de imunoglobuline identice din punct de vedere biochimic si al sarcinii electrice, denumite *proteine de mielom*, deoarece toate celulele tumorii sunt descendente ale unei singure celule producatoare de anticorpi. Moleculele secretate de o tumora de mielom se numesc *proteine M* (*M*ielom) sau *paraproteine* si pot sa reprezinte pâna la 95% din totalul gamaglobulinelor plasmatice.

Tumorile de mielom apar spontan cu o frecventa mica la om, câine, cal, sobolan, soarece sau se induc experimental la soarecii liniilor inbred NZB si BALB/c. Tumora este transplantabila în serie.

Uneori, proteinele M au aceiasi secventa de aminoacizi ca si imunoglobulinele normale, dar adeseori, sinteza catenelor patologice este incompleta: lipsesc diferite secvente de aminoacizi, de diferite lungimi.

Rareori, proteinele de mielom îsi pastreaza chiar proprietatea de a lega specific determinanti antigenici cunoscuti: de exemplu, 5% din proteinele M ale unei linii inbred de soarece, leaga determinanti antigenici ai suprafetei celulelor bacteriene enterice, ceea ce sugereaza ca tumora îsi are originea în descendentii limfocitelor B, care prolifereaza ca raspuns la stimularea specifica cu antigene ale microbiotei enterice.

Tumorile de mielom, de cele mai multe ori, secreta molecule incomplete sau fragmente de molecule imunoglobulinice.

În celulele tumorilor de mielom, rata sintezei catenelor H si L este dezechilibrata. De exemplu, *mielomul Bence-Jones*, sintetizeaza catenele L în mare exces. Proteinele Bence-Jones sunt dimeri de lanturi L (k sau λ). Una din cele doua catene L are rolul catenei H si participa la formarea situsului de legare. Molecula patologica are activitate de anticorp fata de unele componente tisulare sau fata de antigene mici.

Mielomul lanturilor grele sintetizeaza numai catenele H ale izotipurilor α, γ sau μ, iar mielomul macroglobulinemiei Waldenstrom sintetizeaza molecule de IgM. Majoritatea mieloamelor produc proteine Bence-Jones.

În laboratorul clinic, diagnosticul de mielom se pune dupa detectarea în ser, prin electroforeza, a unei cantitati mari de molecule ale unui izotip de imunoglobulina (circa 50 mg/ml).

Proteinele de mielom precipita la 50-60^{o}, la pH 4-6, se redizolva prin încalzire la 80-90^{o} si reprecipita prin racire.

La pacientii cu mielom, în special la cei cu macroglobulinemie Waldenstrom, vâscozitatea sângelui creste mult, datorita cantitatii excesive de proteine produse de mielom. Eliminarea proteinelor patologice se face prin procedeul *plasmaferezei*. Plasmafereza este tehnica de recoltare a unor volume mari de sânge, urmata de reintroducerea în organism, a celulelor sanguine suspendate într-un înlocuitor de plasma.

Surse artificiale de anticorpi monoclonali. Tehnologia hibridomului

Metoda clasica de obtinere a anticorpilor necesari studiilor clinice si de diagnostic, consta în stimularea repetata, prin injectarea antigenului într-un organism cu reactivitate imunitara optima. Când titrul anticorpilor specifici este maxim, animalul este sângerat si se obtine serul imun (antiserul), care este folosit în stare nativa sau este utilizat pentru purificarea anticorpilor. Metoda are câteva dezavantaje:

– cantitatea si calitatea anticorpilor fata de un antigen variaza de la un organism la altul si chiar între sângerarile succesive ale aceluiasi animal;

– serul imun este un amestec foarte heterogen de molecule de anticorpi, chiar si în cazul în care imunizarea se face cu un antigen cu grad înalt de puritate;

– oricât de simplu ca structura moleculara, un antigen are mai multi epitopi care stimuleaza mai multe clone de limfocite, ce produc anticorpi cu specificitati si afinitati diferite;

– antigenele înalt purificate contin impuritati antigenice care induc sinteza anticorpilor specifici în cantitati disproportionat de mari;

– chiar dupa purificare – proces costisitor – antiserurile contin anticorpi cu afinitati diferite si cu reactivitate încrucisata.

Din aceste cauze, toate serurile imune sunt amestecuri de anticorpi *policlonali*, în cantitati variabile de la un organism la altul. Obtinerea unor cantitati mari de anticorpi cu specificitate de legare fata de un epitop unic, prin metoda clasica este imposibila.

Tehnologia moderna de obtinere a anticorpilor omogeni, denumita *hibridoma* (hibrid + mieloma) a fost propusa de Köhler si Milstein (1975), se bazeaza pe urmatoarele principii metodologice si teoretice:

1) Antigenul purificat se injecteaza animalelor de experienta.

2) La momentul adecvat, din splina sau din ganglionii limfatici, se separa limfocitele. Fiecare limfocit si plasmocitele derivate sintetizeaza molecule omogene de anticorpi, cu specificitate unica de combinare pentru un singur epitop, denumiti *anticorpi monoclonali* (*AMC*).

3) Limfocitele B traiesc putin în afara organismului, iar plasmocitele care sintetizeaza cea mai mare cantitate de anticorpi, nu supravietuiesc *in vitro* si de aceea cultivarea sau clonarea lor nu este posibila.

4) Celulele de mielom sunt *nemuritoare*, datorita capacitatii lor de

a se mentine un timp nelimitat în cultura. Fuziunea lor cu limfocitele B *in vitro,* le confera celor din urma proprietatea de “nemurire”, rezultând o celula hibrida(hibridom), care sintetizeaza si secreta anticorpi monoclonali (AMC). AMC sunt considerati ca varianta *in vitro* a proteinelor de mielom, pentru ca în ambele cazuri, o clona de limfocite prolifereaza si secreta anticorpi cu o anumita specificitate

5) Hibridomul producator de anticorpi mosteneste caracteristici atât de la limfocit – adica secreta anticorpi cu specificitate fata de un antigen, cât si de la celula de mielom, adica este *nemuritor*.

6) Celulele hibridoma pot fi clonate individual si fiecare clona produce anticorpi specifici fata de un singur determinant antigenic. Ele pot fi mentinute indefinit prin pasaje *in vivo* sau prin cultivare *in vitro*.

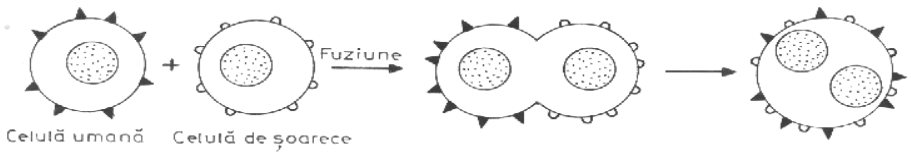


Fig. 91. Biotehnologia *hibridomului* de producere a anticorpilor monoclonali se bazeaza pe fuziunea limfocitului, cu celula tumorala de mielom de soarece. Antigenele membranare specifice ale celor doua celule, se distribuie în mozaic pe suprafata celulei fuzionate heterocarion.

Etapele obtinerii hibridomului

Metodologia obtinerii unei linii celulare hibride, nemuritoare, producatoare de AMC, parcurge mai multe etape.

1. *Obtinerea celulelor de mielom*. Baza tehnologiei hibridomului a fost obtinerea unei linii celulare mutante de mielom, care nu secreta anticorpi si este deficienta pentru *h*ipoxantin-*g*uanozin-*f*osfo-*r*ibozil-*t*ransferaza (HGPRT).

Mielomul (plasmocitomul) este rezultatul diviziunilor necontrolate ale unui singur plasmablast sau ale unui precursor al sau din linia limfocitara B. Proliferarea necontrolata este însotita de sinteza unor cantitati mari de molecule omogene de imunoglobulina, cu proprietati biochimice uniforme. Moleculele sintetizate de tumorile de mielom se deosebesc de imunoglobulinele normale, prin aceea ca nu prezinta specificitate de legare cu antigenul.

Tumorile de mielom apar spontan la multe mamifere, iar la om, 1% din tumori sunt mieloame. Tumorile de mielom se induc experimental la mai multe linii de soarece (BALB/c si NZB), dupa

injectarea intraperitoneala a uleiurilor minerale, sau dupa implantarea materialelor plastice, care produc o reactie inflamatorie cronica. Tumorile apar dupa 120-130 de zile si se pot mentine prin pasaje seriate la soareci din aceiasi linie inbred sau prin cultivare *in vitro* si produc cantitati suficiente de imunoglobuline pentru analiza biochimica. Nu s-au obtinut mieloame care sa sintetizeze anticorpi cu specificitate de legare fata de un antigen.

Hibridoamele se obtin din linii speciale de mielom, care au doua particularitati mutationale:

– nu sintetizeaza propria molecula de imunoglobulina, astfel ca celula hibrida va produce exclusiv molecule de imunoglobulina caracteristice limfocitului B normal;

– sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, necesara sintezei acizilor nucleici.

– Pentru hibridare sunt disponibile linii celulare de mielom de soarece, de sobolan, de om, dar cea mai folosita este linia P_3-X_{63}-Ag_8, izolata de la linia BALB/c, cu urmatoarele caracteristici:

– este $HGPRT^-$;

– este tumorigena pentru soarece;

– are o frecventa relativ înalta ($1/10^5$-10^6) de fuziune cu limfocitele de soarece;

– nu sintetizeaza imunoglobulina proprie si nu represeaza genele pentru sinteza imunoglobulinei în hibridom;

– are o eficienta înalta de clonare *in vitro*.

Deoarece sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, celulele sale nu detoxifica efectul aminopterinei, care se adauga în mediul de crestere. Aminopterina, un antagonist al reductazei acidului folic, blocheaza calea sintezei ADN prin inhibitia sintezei purinelor (A, G) si a timidinei. În mediul cu aminopterina, celulele cu $HGPRT^-$ nu supravietuiesc.

2. Imunizarea. Obtinerea unei populatii mari de limfocite B, prin fenomenul expansiunii clonale, angajate în sinteza anticorpilor specifici fata de un anumit epitop, se realizeaza prin imunizare. Antigenul stimuleaza mai multe clone de limfocite. Fiecare clona de limfocite activate, sintetizeaza anticorpi specifici fata de unul din epitopii antigenului. Procedura de imunizare (cantitatea de antigen, tipul de adjuvant, calea de administrare) este selectata empiric.

Cea mai buna sursa de limfocite ramâne splina de soarece si de sobolan, dar în special soarecele BALB/c, pentru ca mielomul are aceiasi origine si prin hibridare se evita incompatibilitatea CMH. Hibridoamele de sobolan, obtinute prin fuziunea limfocitelor splenice cu

celule de mielom, sunt mai stabile si anticorpii pe care îi sintetizeaza fixeaza complementul.

Cantitatea de antigen necesara pentru imunizare depinde de imunogenitatea acestuia. Antigenele celulare bacteriene sau ale celulei eucariote sunt foarte imunogene. Antigenele solubile (polipeptide, glucide, hormoni) sunt slab antigenice. Imunogenitatea lor creste dupa cuplarea cu hemocianina de *Limulus* (KLH) sau cu albumina. Cea mai buna imunizare se obtine prin injectare intravenoasa sau intraperitoneala repetata, timp de câteva saptamâni sau luni, a antigenului slab imunogen.

Splina se recolteaza înainte de atingerea titrului maxim al anticorpilor serici. Blastele fuzioneaza mai usor decât celulele în repaus.

O alternativa a imunizarii este stimularea limfocitelor *in vitro*, prin incubarea în prezenta antigenului.

3. Fuziunea se realizeaza în scopul "imortalizarii" celulelor producatoare de anticorpi si este esenta biotehnologiei hibridomului. Scopul "imortalizarii"este pastrarea capacitatii limfocitelor individuale de a secreta un singur tip de AMC, prin cresterea nelimitata în timp, fara senescenta, *in vivo* sau *in vitro*, ca o consecinta a transformarii, indusa cu celule de mielom.

Limfocitele sau imortalizat pe trei cai:

– prin fuziune cu celule tumorale de mielom

– prin infectie cu un virus transformant ADN

– prin transfectie cu ADN transformant din celulele maligne sau cu ADN al unui oncodnavirus.

Cea mai utilizata metoda de "imortalizare" este aceea a fuziunii cu o celula de mielom. Fuziunea limfocitelor viabile din splina, obtinute prin dezagregare mecanica, cu celulele de mielom $HGPRT^-$ se realizeaza prin amestecul lor în proportie de 2-5 celule splenice/o celula de mielom.

Procesul fuziunii este stimulat pe mai multe cai, dar cel mai adesea se foloseste PEG cu gr. mol. de 4000 D. Amestecul de celule se mentine 3 minute în 0,20-0,50 ml PEG 40%, la 37^0, pH 7,5-8,0. Frecventa fuziunii creste sub actiunea impulsurilor electrice scurte, de mare intensitate.

Numarul si varietatea hibridoamelor obtinute este mare, ceea ce impune selectia celor producatoare de anticorpi cu specificitatea dorita.

4. Selectia celulelor de hibridom. Amestecul de fuziune contine celule splenice si celule de mielom nefuzionate, celule splenice fuzionate între ele, celule de mielom fuzionate între ele si celule *hibridom*, rezultate prin fuziunea splenocitelor cu celule de mielom.

Selectia are ca scop, separarea celulelor de hibridom si eliminarea din amestec, a celorlalte tipuri celulare, nefuzionate sau fuzionate

neutilizabile. In acest scop, amestecul de celule se cultiva pe *mediul selectiv HAT* (*h*ipoxantina-*a*minopterina-*t*imidina), în care splenocitele nefuzionate si fuzionatii splenocit x splenocit mor în 1-2 saptamâni, coplesite fiind numeric de celulele de hibridom, care se divid la fiecare 17-24 de ore.

Mediul selectiv HAT permite supravietuirea numai a *fuzionatilor mielom x splenocit* si este inhibitor pentru celulele de mielom, ca si pentru fuzionatii mielom x mielom. Actiunea sa selectiva se bazeaza pe urmatoarele conditii experimentale:

a) Aminopterina din mediul HAT blocheaza sinteza purinelor (A, G) pe calea inozin-monofosfatului si astfel blocheaza sinteza acizilor nucleici. In acest mediu, celulele $HGPRT^-$ devin dependente de surse externe de purine (A, G) si de timidina. Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertita la inozin-monofosfat, de catre enzima HGPRT si se formeaza adenozin-monofosfat si guanozin-monofosfat. Timidina poate fi fosforilata la timidin-monofosfat si timidin-trifosfat, de catre enzima TK. Ambele enzime (HGPRT si TK) se gasesc în splenocitele normale.

b) Celulele de mielom sunt $HGPRT^-$ si pe mediul selectiv HAT nu supravietuiesc nici celulele ca atare, nici fuzionatii mielom-mielom. Pe acest mediu supravietuiesc si se divid indefinit, celulele de hibridom, deoarece sunt $HGPRT^+$ (codificata de genomul splenocitelor) si sunt “nemuritoare”, calitate conferita de celulele de mielom.

5. *Clonarea*. Clona este o populatie de celule identice, genetic stabile, derivate din diviziunea unei singure celule. Clonarea se face prin diseminarea suspensiei celulare diluate, pe medii nutritive agarizate. Fiecare celula de hibridom, prin diviziuni succesive, produce *o colonie*, adica *o clona celulara*. Operatia de clonare se repeta pentru a garanta o descendenta omogena.
Dintre sutele de hibridoame clonate, este necesara selectarea celor cu capacitate de sinteza a anticorpilor specifici fata de antigenul cu care s-a facut imunizarea.

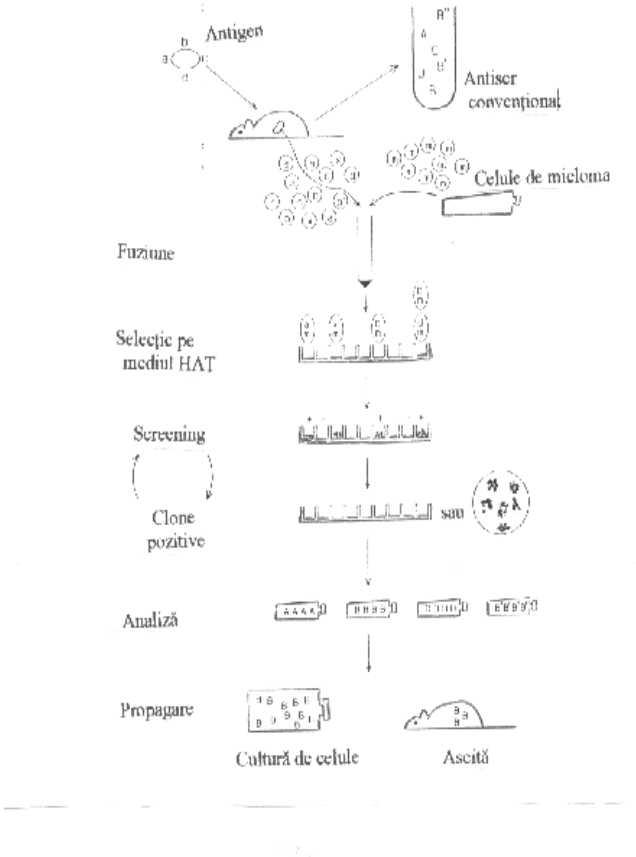


Fig. 92. Ilustrarea schematica a etapelor *producerii anticorpilor monoclonali* (AMC). Animalele, de obicei soareci, sunt imunizate cu un antigen (de exemplu, un microorganism care contine 4 antigene de suprafata - a, b, c, d). Fiecare antigen contine un numar de epitopi, de exemplu molecula b contine epitopii b, b', b". Serul animalelor imunizate este policlonal si contine anticorpi A, B, B', B", C, D. Prima treapta în producerea AMC este obtinerea suspensiilor de celule B si celule de mielom. In etapa urmatoare, cele doua populatii de celule (**m** si **s**) sunt puse în amestec, în prezenta PEG, ca agent de fuziune. Suspensia se repartizeaza în godeurile unei placi pentru cultivarea celulelor, la o dilutie adecvata astfel încât, fiecare godeu sa nu contina mai mult decât o celula hibrida. Celulele se cultiva în mediu HAT pentru a inhiba cresterea celulelor de mieloma nefuzionate. Celulele splenice nefuzionate nu se divid si mor dupa câteva zile. In procesul de selectie mor si fuzionatii *s - s* si *m - m.* Supravietuiesc si prolifereaza fuzionatii *am, bm, b'm, dm* si *xm*. Clonarea se repeta. Hibridoamele se cultiva si se determina specificitatea anticorpilor sintetizati. Cele care sintetizeaza anticorpi cu specificitatea necesara se propaga în recipiente mai mari în care se obtin 1-10 μl/ml. Celulele pot fi injectate în cavitatea peritoneala de soarece, unde se multiplica sub forma ascitei si produc 1 mg/ml anticorpi specifici.

Hibridoamele producatoare de anticorpi cu specificitatea dorita, se cultiva *in vitro*, în culturi cu perfuzie continua cu mediu proaspat sau în bioreactoare cu capacitate mare.

Cea mai simpla tehnica este a cultivarii *in vivo* si consta în inocularea intraperitoneala a circa 2 x 10^6 celule hibridoma, la organisme ale aceleasi linii genetice (pentru evitarea fenomenului de incompatibilitate CMH). Hibridomul se dezvolta intraabdominal si lichidul de ascita care o însoteste, contine anticorpi în proportie de 50% din totalul proteinelor sale.

Randamentul producerii AMC *in vivo* este de 100-1000 de ori mai mare decât *in vitro*. Anticorpii din lichidul ascitic se purifica prin fractionare cu sulfat de amoniu sau prin metoda cromatografiei cu schimb de ioni.

Avantajele biotehnologiei hibridomului

Producerea AMC prin tehnologia hibridomului are un avantaj net fata de metoda conventionala a obtinerii serului imun, deoarece se pot obtine anticorpi specifici produsi de câte un hibridom, pentru fiecare epitop al unui antigen natural. Clonarea individuala a fiecarui hibridom, creeaza conditii ca fiecare clona celulara sa secrete anticorpi cu specificitate unica fata de un singur epitop al unui antigen.

Celulele de hibridom prolifereaza rapid, ceea ce scurteaza timpul necesar obtinerii AMC.

Hibridoamele produc cantitati foarte mari de anticorpi, ce depasesc de câteva ori concentratia anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Clonele de hibridom se mentin indefinit prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*.

Hibridomul ofera posibilitatea obtinerii *AMC marcati*, prin adaugarea precursorilor marcati radioactiv (marcare interna). Anticorpii marcati *in situ* (în timpul sintezei) ofera un avantaj net în raport cu anticorpii marcati dupa purificare (marcare externa). Marcarea externa cu I^{125} implica purificarea imunoglobulinelor din antiserul conventional, dar presupune modificarea chimica si denaturarea partiala, cu pierderea proportionala a specificitatii de legare.

Pentru marcarea interna se folosesc elemente radioactive cu perioada de înjumatatire mai lunga decât a I^{125} : C^{14}, S^{35}, H^3. Marcajul radioactiv intern este net superior celui cu peroxidaza si feritina, utilizat în tehnicile conventionale.

Tehnologia hibridomului este un model experimental care poate fi extins si la alte categorii de celule care sintetizeaza substante utile (interferon, insulina). Obtinerea unor hibrizi dintre celula de mielom de soarece si un limfocit normal, de la aceiasi specie, în scopul producerii AMC, a introdus un concept nou în biologia moleculara - *conceptul imortalizarii functiilor specifice diferentiate*.

Aplicatii practice ale AMC

AMC reprezinta un reactiv imunochimic bine definit si de aceea, rezultatele obtinute prin utilizarea lor sunt reproductibile.

AMC se folosesc ca reactivi de mare specificitate în *cercetare*, în diagnosticul *clinic*, în *farmacologie* pentru *profilaxia si terapia* unor infectii la om si animale, în tehnicile de *biochimie* analitica pentru purificarea unor molecule.

În domeniul *cercetarii imunocitochimice**, AMC sunt reactivi cu înalta specificitate, utilizati pentru identificarea unor proteine care se gasesc în cantitati foarte mici. De exemplu, AMC marcati cu fluoresceina permit evidentierea moleculelor membranare, inaccesibile investigatiei cu metodele clasice. AMC au fost markeri eficienti pentru identificarea diferitelor subpopulatii de limfocite T si B, a antigenelor membranare ale celulelor seriei mieloide si monocitare. Sistemul CD (*c*luster *d*ifferentiation) este definit în întregime pe baza utilizarii AMC si cuprinde acum peste 200 de markeri de suprafata. AMC cu specificitate CD se folosesc pentru a detecta aparitia sau absenta populatiilor celulare în timpul stimularii antigenice.

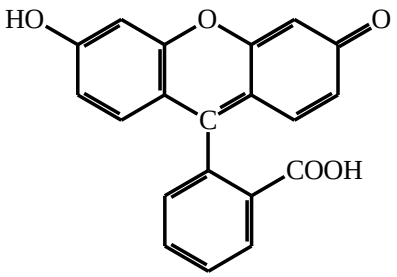


Fig. 93. Structura *fluoresceinei*.

Datorita specificitatii lor de legare, AMC se folosesc pentru a evidentia diferentele antigenice minore între diferite variante moleculare. Astfel sau identificat variatiile compozitiei în aminoacizi ale spiculelor glicoproteice, consecutive driftului antigenic la virusul influenza A.

AMC se folosesc pentru identificarea moleculelor

neurotransmitatoare, a receptorilor sinaptici si a enzimelor de biosinteza. S-au obtinut AMC fata de receptorul de acetilcolina, dar dificultatile sunt mari pentru ca neurotransmitatorii sunt antigene slabe.

În *diagnosticul serologic*, serurile imune obtinute prin metoda clasica au avut adeseori inconvenientul major al lipsei reproductibilitatii rezultatelor. AMC se folosesc ca reactivi de mare specificitate pentru diagnosticul rabiei pe sectiunile de tesut nervos al animalelor infectate,

Anticorpul este marcat cu o molecula generatoare de semnal (de exemplu, un fluorocrom, o enzima producatoare de culoare prin actiunea sa asupra substratului specific, ori o particula metalica). Sensibilitatea metodei, adica puterea semnalului poate fi marita prin cresterea raportului dintre molecula indicator (anticorpul marcat) si antigen. Imunocitochimia necesita producerea anticorpilor specifici si tratamentul adecvat al tesuturilor, adica fixarea si histopregatirea pentru a favoriza interactiunea optima între reactiv si molecula tinta a hepatitelor virale B, C, D, a infectiei cu HIV (prin determinarea prezentei antigenelor în ser) si a unor infectii bacteriene. Pentru diagnostic se folosesc anticorpi marcati cu fluoresceina sau metodele ELISA sau RIA.

AMC se folosesc pentru *diagnosticul neoplaziilor*, pe baza evidentierii antigenelor specific-tumorale. In acest scop se utilizeaza AMC marcati cu izotopi radioactivi, cu specificitate fata de CEA, AFP etc.

AMC se folosesc pentru *detectarea hormonilor* polipeptidici: TSH, FSH, HCG. Hormonii sunt molecule cu un numar mic de epitopi. Subunitatile α ale diferitilor hormoni sunt foarte asemanatoare, dar difera în special prin catenele β. Exista AMC specifici pentru ambele subunitati si AMC care recunosc epitopii conformationali ai moleculei native.

AMC se folosesc în *farmacologie*. In scop *profilactic* se fac imunizari pasive fata de infectiile bacteriene care nu beneficiaza de preparate vaccinale si sunt rezistente la antibiotice: *Pseudomonas, Clostridium.*

În scop *terapeutic*, AMC se folosesc pentru tratamentul rabiei, pentru neutralizarea endotoxinelor (LPS) produse de infectiile cu bacterii Gram negative, consecutive arsurilor. Septicemiile sunt cauzate de o larga varietate de bacterii Gram negative, toate având în comun lipidul A în structura chimica a LPS. Pentru tratamentul majoritatii infectiilor bacteriene se utilizeaza antibiotice, la un pret de cost inferior în raport cu AMC.

AMC se folosesc în *controlul fertilitatii*: AMC anti-HCG si anti-zona pelucida sunt folositi pentru imunizarea pasiva a femeilor fertile.

Speranta utilizarii AMC în tratamentul tumorilor s-a naruit. Una din

cauze este ca majoritatea tumorilor umane îsi au originea în celulele epiteliale ale colonului, sânului, plamânului si prostatei, iar oncogenele activate codifica proteine intracelulare, inaccesibile terapiei cu AMC. Frecventa acestor tumori nu creste la persoanele imunosupresate, ceea ce este un argument în favoarea codificarii antigenelor intracelulare, inaccesibile sistemului imunitar. Chimioterapia ofera mult mai multe sanse de succes, la un pret de cost inferior.

În sistemul hematopoietic si imunitar, AMC se folosesc pentru a distruge toate populatiile celulare, cu exceptia celulelor stem, cu scopul eliminarii celulelor malignizate si a precursorilor ei care poarta oncogena activata.

AMC se folosesc pentru *neutralizarea* nivelelor toxice ale unor medicamente (digoxina).

AMC se folosesc ca agenti *imunosupresori*. Receptorilor de grefa li se administreaza AMC specifici fata de complexul antigenic membranar CD_3, în cazurile în care imunosupresia chimica (cu ciclosporina) nu reuseste.

În maladiile autoimune, AMC se administreaza pentru a realiza o imunosupresie partiala, care sa permita apararea fata de infectiile cu agenti oportunisti.

AMC se folosesc pentru producerea *imunotoxinelor* (conjugate AMC-medicamente). Medicamentele utilizate sunt agenti citotoxici, care, prin intermediul situsului de legare a AMC, sunt destinate sa se lege specific de celulele tinta(de exemplu, celulele maligne). In acest scop sunt necesari AMC cu o afinitate înalta a specificitatii de legare fata de antigene specific tumorale. AMC se cupleaza cu toxine (difterica, ricina, abrina), cu medicamente citostatice sau cu radionuclizi.

AMC se folosesc în tehnicile de *biochimie* analitica, în scopul purificarii proteinelor, sub forma coloanelor de afinitate imunoabsorbante. AMC sunt imobilizati pe suporturi în coloane solide (imunosorbenti), prin care este trecut amestecul de proteine. In coloana sunt retinute specific, moleculele care se leaga cu AMC. Astfel se purifica proteine care se gasesc în amestec, în concentratii foarte mici (IFN).

Capitolul 7

MECANISME DE APARARE ANTIINFECTIOASA

Sistemul imunitar a evoluat si s-a complexat structural si functional, în conditiile presiunii selective permanente pe care o exercita agentii infectiosi, ce tind sa invadeze, sa colonizeze si sa se multiplice în tesuturi. Structura sistemului imunitar este o reflectare directa a interactiunilor sale cu diversitatea agentilor infectiosi care-l stimuleaza. Cele doua forte opozante s-au modelat reciproc, într-un conflict constant. Gazdele care nu neutralizeaza agentul infectios sunt sortite mortii, iar cele care supravietuiesc sunt mai bine adaptate sa reziste infectiilor ulterioare.

Raspunsul imun fata de un microorganism sau fata de un virus este foarte complex, comparativ cu raspunsul imun fata de un antigen macromolecular, datorita complexitatii lor antigenice. Cele mai simple virusuri induc sinteza anticorpilor cu câteva specificitati distincte, iar parazitii pluricelulari au pe suprafata lor, un numar nedefinit de antigene diferite. Celulele bacteriene ocupa o pozitie intermediara, atât în privinta complexitatii structurale cât si a heterogenitatii antigenelor. Fiecare tip structural de molecula poate sa contina câtiva epitopi diferiti sau repetitivi.

Problema heterogenitatii antigenice a virusurilor si bacteriilor patogene este importanta nu numai din punct de vedere teoretic, ci este esentiala pentru aspectul practic al *vaccinarii*, deoarece exista riscul stimularii raspunsului imun fara eficienta protectoare. Consecinta stimularii unui raspuns imun ineficient poate fi agravarea maladiei infectioase sau chiar activarea mecanismelor patogenitatii autoimune.

Evaluarea imunogenitatii moleculelor structurilor suprafetei virusurilor si bacteriilor este dificila, deoarece o molecula în solutie poate avea o alta configuratie a epitopilor decât în ansamblul structural nativ. Diferenta deriva din raporturile sale spatiale cu moleculele vecine, pe suprafata agentului infectios. Din aceasta cauza, raspunsul imun al organismului, la stimularea cu un agent patogen, ramâne un domeniu de studiu practic nelimitat. O alta complicatie este consecinta faptului ca specificitatea antigenica a unor molecule este, uneori, variabila de la o tulpina la alta, atât la virusuri cât si la bacterii. Raspunsul imun trebuie

sa contracareze nu numai diversitatea antigenelor la care este expus, ci trebuie sa gaseasca solutia de raspuns, pentru variatia biochimica a unei structuri, la diferite tulpini de microorganisme.

RASPUNSUL IMUN SPECIFIC ANTIINFECTIOS

Raspunsul imun antibacterian si antiviral are atât o componenta humorala cât si una celulara. Prevalenta unuia sau altuia dintre cele doua compartimente este diferita în functie de natura agentului infectios. De cele mai multe ori, predomina raspunsul imun mediat humoral, iar în cazuri mai rare (de exemplu, infectia cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*) este preponderent raspunsul imun mediat celular.

Raspunsul imun fata de diferite antigene ale agentilor patogeni are grade variate de protectie antiinfectioasa, în functie de natura agentului, de gradul sau de virulenta si de natura raspunsului imun pe care-l initiaza. Uneori, raspunsul imun antiinfectios este putin benefic pentru gazda sau este chiar detrimental, din diferite cauze:

– raspunsul imun este orientat fata de componente moleculare neesentiale ale agentului infectios. Stimularea antigenica activeaza un raspuns imun ineficient. Anticorpii nu au efect neutralizant al infectiozitatii, pentru ca structurile de care se leaga specific nu constituie situsuri critice ale agentului patogen (de exemplu, anticorpii antiflagelari, care *in vitro* determina aglutinarea, *in vivo* au o eficienta mai scazuta, limitata la imobilizarea celulelor bacteriene);

– raspunsul imun poate produce leziuni mai puternice si mai extinse decât însusi agentul infectios. Infectia propriu-zisa produce leziuni minime, dar activarea imunitatii mediate celular amplifica leziunile tisulare si grabeste evolutia procesului infectios (de exemplu, leziunile consecutive infectiei cu virusul corio-meningitei limfocitare la soarece si liza hepatocitelor infectate cu virusul hepatiei B umane).

Componentele structurale antigenice ale unui agent infectios, care stimuleaza un raspuns imun protector se numesc *situsuri critice* sau structuri *imunodominante*.

Un raspuns imun eficient (protector) trebuie sa aiba ca rezultat final, lezarea structurii peretelui bacterian, fungic sau a învelisului viral, prin actiunea combinata a anticorpilor si a proteinelor complementului.

Structura antigenica a celulei bacteriene

Multe molecule bacteriene moduleaza activitatea sistemului imunitar, având ori un efect stimulator (adjuvant), ori diminua reactivitatea imunitara. Ele modifica raspunsul celulelor imunitare

competente, prin mecanisme de semnalizare. De aceea se numesc molecule *imunomodulatoare.* Efectele lor realizeaza un echilibru complex între mecanismele de recunoastere si neutralizare a antigenelor si virulenta bacteriana. Imunomodulatorii pot avea efecte asupra limfocitelor T, B si asupra macrofagelor, similare cu cele produse de citochine.

Imunomodulatorii cu activitate mitogenica, induc *activarea policlonala* a limfocitelor T si B, care se deosebeste de activarea specifica. Rezultatul este sinteza anticorpilor cu specificitati multiple, dintre care, o fractie sunt specifici fata de agentul infectios. Desi fara specificitate, sinteza rapida a anticorpilor poate fi suficienta pentru stoparea infectiei.

Moleculele imunomodulatoare modifica nu numai reactivitatea imunitara, ci si mobilitatea celulelor, în special a fagocitelor (de exemplu, pot inhiba migrarea macrofagelor din focarul inflamator). Daca moleculele imunomodulatoare persista în tesuturi, stimuleaza cronic sistemul imunitar, cu efecte patologice autoimune, cea mai cunoscuta fiind artrita de adjuvant.

Multe molecule imunomodulatoare de origine bacteriana au efecte mai generale, care se extind asupra altor sisteme: ele produc febra, influenteaza sistemul de coagulare sanguina, concentratia ionilor, a Fe etc.

Moleculele bacteriene cu rol imunomodulator sunt localizate pe suprafata celulei. Ele sunt polimeri ai învelisului, dar si molecule excretate, cu efect toxic. Pe de alta parte, eficienta raspunsului imun antibacterian, depinde de raportul dintre reactivitatea sistemului imunitar si mecanismele de autoprotectie ale bacteriei, menite sa devieze raspunsul imun.

Din punct de vedere antigenic, bacteriile interactioneaza cu gazda prin modalitati diverse. La o extremitate sunt cele lipsite de atributul invazivitatii, care produc cantitati mici de toxine, iar la cealalta, sunt bacteriile care cresc cu o rata înalta în tesuturi sau în sânge si produc *septicemii*. Unele bacterii prezinta determinanti antigenici asemanatori ca structura chimica, moleculelor self ale organismului gazda. Raspunsul imun specific va fi absent ori nesemnificativ, sau efectorii imunitari dau reactii încrucisate cu moleculele self. Alteori, suprafata bacteriana poseda determinanti antigenici de natura proteica sau polizaharidica, inductori ai raspunsului imun.

Cele mai semnificative structuri bacteriene din punct de vedere antigenic sunt cele parietale: peptidoglicanul din peretele Gram pozitiv si Gram negativ, peptidoglicolipidele din peretele complex al micobacteriilor si structurile parietale ale spirochetelor. Toate tipurile

structurale de perete contin mureina (peptidoglican), dar se deosebesc prin alte numeroase componente chimice cu semnificatie antigenica.

Unitatea minima a peptidoglicanului care pastreaza activitatea imunostimulatoare este N-acetil-muramil-L-alanina-D-izoglutamina (*m*uramil *dip*eptid- MDP). Atât componenta glucidica cât si aminoacizii MDP au functie imunomodulatoare.

A II-a clasa de polimeri imunomodulatori sunt *acizii teichoici si lipoteichoici* ai bacteriilor Gram pozitive.

Proteinele de suprafata asociate peretelui celular au, uneori, semnificatie antigenica. Cea mai cunoscuta este *proteina M* de la *Str. pyogenes* (grup A), care confera specificitate de tip. S-au identificat peste 80 de variante antigenice, cu rol de factor de virulenta.

Componentele antigenice esentiale ale membranei externe a bacteriilor Gram negative sunt *lipopolizaharidele* (LPS), a caror specificitate este conferita de polizaharidul O, o structura imunodominanta care cuprinde pâna la 40 de unitati glucidice. Numeroasele variatii structurale ale catenei glucidice determina existenta unui numar corespunzator de variante antigenice bacteriene. LPS este componentul principal al bacteriilor Gram negative, activator al raspunsului imun înascut, prin componentul sau lipidic. Termenii “LPS” si “endotoxina” sunt frecvent utilizati cu acelasi sens. LPS trebuie sa desemneze moleculele purificate, iar termenul de “endotoxina” semnifica LPS si proteinele asociate din membrana externa, eliberate din suprafata celulei.

LPS sunt molecule *amfifile*, ceea ce conditioneaza interactiunea lor cu celulele organismului. Ele au o regiune *hidrofoba*, capabila sa stabileasca legaturi cu lipidele membranare si o parte *hidrofila*, care poate ramâne în faza apoasa. O prima modalitate de interactiune este cea *directa*, dintre molecula amfifila si suprafata celulei. Molecula LPS poate fi inserata în membrana celulei, prin jumatatea hidrofoba sau se leaga de receptorii membranari prin jumatatea hidrofila.

A II-a modalitate de interactiune a moleculei LPS cu celulele este *indirecta*, mediata de *p*roteina care leaga (*b*inding) *L*PS (LBP). Molecula de LPS este recunoscuta si legata de o glicoproteina plasmatica de 60 kD, din categoria *proteinelor de faza acuta*. Este sintetizata de hepatocite si are un situs de legare pentru lipidul A.

Polizaharidele capsulare ale unor bacterii patogene Gram pozitive si negative, libere în supernatant sau legate de perete, sunt foarte imunogene daca contin lipide sau proteine terminale. Variatia lor biochimica deriva nu numai din schimbarea ordinii unitatilor glucidice componente, ci, în primul rând, din posibilitatea legarii monozaharidelor

de oricare din cei 6 atomi ai hexozei adiacente. Diferentele de secventa a monozaharidelor genereaza determinanti antigenici care nu reactioneaza încrucisat cu anticorpii specifici fata de un alt determinant cu aceiasi compozitie.

Toxinele de natura proteica sunt imunogene si stimuleaza raspunsul imun cu efect protector.

Peretele celular al *micobacteriilor* este foarte rezistent la actiunea factorilor litici. In alcatuirea sa intra glicolipide, formate din resturi de *acid micolic*, legati covalent de resturile de arabino-galactan (*lipoarabinogalactan*) si arabinomanan (*lipoarabinomanan*). Complexul glicolipidic se leaga de peptidoglican, prin punti fosfat.

Membrana externa a spirochetelor este bogata în *lipide si lipopeptide*, stimulatoare ale raspunsului imun si ale reactiilor de hipersensibilitate.

Bacteriile toxigene, lipsite de invazivitate (*C. diphteriae, C. tetani*, clostridiile enterice) stimuleaza raspunsul imun humoral antitoxic.

Bacteriile invazive determina infectii regionale sau generalizate (sistemice). Majoritatea se multiplica în spatiile extracelulare, unele au localizare facultativ intracelulara, iar altele sunt obligat intracelulare.

Bacterii cu localizare extracelulara	Bacterii facultativ intracelulare	Bacterii obligat intracelulare
Streptococcus sp	*Mycobacterium tuberculosis*	*Rickettsia*
Staphylococcus sp	*M. leprae*	*Chlamydia*
Neisseria sp	*Brucella sp.*	
Escherichia coli	*Listeria monocytogenes*	
Klebsiella sp.	*Yersinia sp.*	
Proteus sp.	*Salmonella typhi*	
Pseudomonas sp.	*S. paratyphi*	
Bacteroides fragilis	*Treponema pallidum*	
Haemophilus influenzae		
Actinomyces sp.		

Bacteriile cu localizare *extracelulara* induc un *raspuns imun mediat humoral*. Activarea limfocitelor B este rezultatul cooperarilor celulare macrofag-limfocit B-limfocit Th. In focarul de inflamatie, bacteriile cu localizare extracelulara determina formarea abcesului, în care predomina polimorfonuclearele

Bacteriile cu localizare intracelulara induc, preponderent, un *raspuns imun mediat celular*. Persistenta lor în celulele fagocitare are ca rezultat final, formarea *granulomului*. Cele mai tipice pentru natura lor imunitara sunt granuloamele care se formeaza în infectiile cu *M. tuberculosis* si cu *M. leprae*.

Mecanisme prin care microorganismele evita apararea gazdei .

Infectiozitatea microorganismelor patogene este dependenta de capacitatea lor de a coloniza tesuturile gazdei si de a contracara mecanismele de aparare ale gazdei. Capacitatea de variatie rapida a moleculelor de suprafata este o trasatura evolutiva comuna în tot spectrul patogenilor. Se cunosc exemple de bacterii patogene care au elaborat mecanisme ce permit *variatia antigenica* rapida si eficienta. Moleculele de suprafata prezinta regiuni bine conservate, ancorate în membrana, dar nu sunt niciodata expuse contactului cu sistemul imunitar al gazdei. Rata înalta de mutatie produce un numar mare de variante antigenice. Astfel, în patogeneza gonoreii si meningitei, cauzate de *Neisseria* sp, rolul fimbriilor este esential pentru atasarea de celulele epiteliale. Moleculele de fimbrilina evidentiaza secvente constante, semivariabile si hipervariabile. Regiunile hipervariabile determina antigenitatea acestor structuri si tropismul fata de celulele epiteliale ale tractului urogenital uman. *N. meningitidis* este capsulata si numai fimbriile proemina dincolo de limitele stratului polizaharidic. De aceea, pierderea fimbriilor inhiba proprietatea de aderenta.

Polizaharidul capsular este *repelent* pentru fagocite, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru polizaharidele capsulare. Uneori, acestea sunt asemanatoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explica slaba lor imunogenitate. Tulpinile variante, necapsulate sunt mai putin virulente, dar au avantajul ca nu sunt recunoscute de anticorpii specifici fata de antigenele capsulare. Absenta capsulei, la *Haemophilus influenzae*, confera celulei o capacitate sporita de a se atasa si de a invada celulele epiteliale ale gazdei.

La *Str. pyogenes* s-au identificat peste 80 de serotipuri diferite, ce rezulta din mutatiile punctiforme ale genei ce codifica *proteina M*, componenta a peretelui celular.

LPS protejeaza fizic celula bacteriana de actiunea complementului si a fagocitelor, constituind un strat protector, iar diversitatea glucidelor din oligozaharidul terminal, confera o variatie antigenica extrem de larga. La. *S. typhimurium* s-au identificat peste 2000 de variante antigenice, cu tot atâtea specificitati serologice.

La spirocheta *Borrelia hermsii* (agentul febrei recurente, caracterizata prin crize febrile, separate de intervale asimptomatice), episoadele febrile semnifica aparitia si multiplicarea unei noi variante antigenice. Antigenul variant este o *proteina* abundenta *a membranei externe* (VMP = *v*ariable *m*ajor *p*rotein).

Unul dintre cele mai bine studiate exemple de variatie antigenica si rolul ei în infectie, este al tripanosomelor africane care produc boala somnului. *T. brucei* produce o parazitemie, care creste si descreste, deoarece genereaza subpopulatii care sunt variante antigenice ale unei *glicoproteine specifice* (VSG – *v*ariant-*s*pecific *g*lycoprotein) a suprafetei celulei. Undele de parazitemie constituie trasatura principala a infectiei cronice, care persista pâna când individul tratat se vindeca, ori netratat, moare. In stadiile terminale, agentul patogen invadeaza alte tesuturi si capacitatea de aparare este depasita.

În cursul infectiei, numarul mare de paraziti, da nastere la o subpopulatie care poarta o VSG modificata biochimic si antigenic, ce scapa controlului imediat al raspunsului imun. Ulterior, aceasta varianta noua este recunoscuta de sistemul imunitar, dar generarea rapida a noilor VSG împiedica eliminarea infectiei. Capacitatea parazitului de a se comuta la diferite VSG duce la epuizarea fortelor de aparare ale gazdei în fazele terminale ale bolii.

Infectia cu *Plasmodium falciparum* este persistenta, recurenta si se caracterizeaza printr-un tablou foarte variabil al manifestarilor clinice. Imunitatea specifica se dezvolta lent si numai dupa infectii ample si repetate, se consolideaza un raspuns imun protector fata de infectia severa, dar este o imunitate incompleta si incapabila sa sterilizeze organismul. In ariile geografice cu o rata înalta de transmitere a parazitului, apar complicatii severe, cu mortalitate crescuta, la copiii sub 5 ani. Copiii care depasesc 5 ani, au imunitate adecvata pentru a controla infectia. Starea de protectie persista tot restul vietii, în conditiile inocularii continue a sporozoitilor de la tântarii infectati. Raspunsul imun fata de antigenele parazitului este mediat de anticorpi (IgG). La pacientii cu SIDA (care exacerbeaza dramatic evolutia tuberculozei sau infectiile oportuniste), malaria nu are o evolutie mai severa, ceea se înseamna ca sinteza IgG este independenta de celulele T. Eritrocitele infectate sunt ingerate de macrofage, independent de IFN.

Diversitatea antigenica a tulpinilor de *Plasmodium* este argumentata de miniepidemiile de malarie severa, care apar în zonele endemice mari. Tulpinile mai virulente au proprietati *antigenice* si de *citoaderenta* modificate. Diferentele proprietatilor de aderenta produc manifestari severe, inclusiv *malarie cerebrala*, iar modificarile de antigenitate permit parazitului sa persiste si sa produca infectii repetate.

Moleculele de suprafata ale eritrocitelor infectate cu *P. falciparum* prezinta *variatie antigenica*, ceea ce conditioneaza *citoaderenta*. Aderenta eritrocitelor infectate, de tesutul cerebral, renal sau hepatic, este cauza malariei severe. Generarea continua a diferitelor populatii variante antigenice de paraziti, cu diferite specificitati de aderenta, este

cauza infectiilor persistente caracterizate prin unde de parazitemie si manifestari clinice specifice malariei.

Diversitatea fenotipica corespunzatoare variatiei antigenice este o strategie foarte eficienta pentru adaptarea la presiunea selectiva pe care o exercita efectorii raspunsului imun si la diversitatea de particularitati structurale si functionale ale tesuturilor gazdei. Mecanismele de variatie sunt deosebit de importante pentru succesul diseminarii unei infectii în populatia gazda.

Raspunsul imun în infectiile virale

Infectiile virale constituie, înca, o cauza majora a morbiditatii si mortalitatii, desi vaccinarea a redus incidenta infectiilor severe (polio, oreion, rujeola, rubeola) si a eradicat variola. Cunoasterea mecanismelor raspunsului imun antiviral este importanta pentru evaluarea problemelor clinice de fond (de exemplu, dinamica raspunsului imun) si pentru cautarea unor noi metode de obtinere a vaccinurilor.

Interactiunea virusurilor cu organismele, este modulata de sistemele de aparare înascute si dobândite. Pentru a se perpetua într-o populatie, virusul trebuie sa fie virulent, dar suficient de flexibil în modularea virulentei, pentru a se pastra în populatia sensibila. In perspectiva evolutiva, interactiunea virusului cu organismul sensibil trebuie sa confere superioritate virusului. Daca este prea virulent si nu poate fi controlat de imunitatea gazdei, rezultatul poate fi moartea si în final disparitia gazdei. Daca este lipsit de virulenta, virusul va fi eliminat prea rapid de sistemul imunitar al gazdei si poate sa dispara prin incapacitatea de a se perpetua.

Adeseori, virulenta virala este diminuata prin *mutatie* si în acelasi timp se selecteaza gazde mai bine adaptate imunitar, rezultând un echilibru fluctuant, în care coexista atât gazda cât si virusul.

Proteinele virale, componente ale capsidei si peplosului, sunt imunogene si induc un raspuns imun intens în organismul infectat. Raspunsul imun antiviral este orientat atât fata de antigenele exprimate pe suprafata virionilor, cât si fata de antigenele prezentate pe suprafata celulei infectate.

Antigenele expuse pe suprafata celulei infectate, difera în functie de natura virusului (nud sau acoperit) si de mecanismul maturarii virionilor. Celulele infectate cu virusuri nude (adeno-, reo-, enterovirusuri) expun pe suprafata lor proteine virale asociate cu

moleculele CMH I, iar cele infectate cu virusuri învelite, în special cu virusuri care se matureaza prin înmugurire la nivelul membranei, expun glicoproteinele peplosului, inserate în arii limitate ale membranei. In ambele cazuri, celula infectata devine tinta mecanismelor de recunoastere imunitara.

Antigenele expuse pe suprafata virionului sau a celulei infectate, stimulatoare ale raspunsului imun, se numesc *antigene protectoare*. Antigenele intrinseci ale virionului, au rol protector nesemnificativ, deoarece nu vin în contact cu sistemul imunitar, decât în cazul în care se sintetizeaza în exces si se elimina din celula infectata.

Antigenele virale libere sau asociate virionului, stimuleaza *raspunsul imun humoral*, iar cele prezentate pe suprafata celulelor infectate, stimuleaza *raspunsul imun celular*.

Activarea unuia sau altuia dintre compartimentele imunitatii, depinde de mai multi factori: de tipul de infectie (primara sau secundara), de rezultatul interactiunii virus-celula (liza sau infectie persistenta) etc.

Virusurile care produc *infectii acute*, determina o competitie între replicarea virala si efectorii raspunsului imun. Rezultatul este însanatosirea sau moartea gazdei.

Pentru virusurile care produc *infectii cronice*, scara de timp este mai lunga. Virionii sau antigenele virale din sânge sau din alte fluide, determina formarea complexelor Ag-Ac, cu manifestari patologice secundare. Alteori, anticorpii antivirali si celulele T activate, pot produce leziuni ale celulelor infectate. Majoritatea manifestarilor clinice care însotesc infectiile virale cronice, sunt consecinta raspunsului imun al gazdei, stimulat de antigenele virale.

Raspunsul imun primar

Mecanismele de aparare nespecifica (interferonul, actiunea celulelor NK, raspunsul mucociliar) pot influenta rezultatul infectiei.

Dupa infectia virala primara sau dupa administrarea vaccinului inactivat, se stimuleaza raspunsul imun mediat celular(citotoxic) si humoral. Raspunsul humoral, cu sinteza anticorpilor, are o dinamica lenta. In stadiul acut al infectiei, titrul anticorpilor specifici este abia detectabil, dar atinge valoarea maxima la 2-4 saptamâni si persista saptamâni sau luni, în functie de gazda, virus etc. Pentru virusul febrei galbene si cel rujeolic, nivelul detectabil al anticorpilor persista tot restul vietii.

Dupa infectia primara sau dupa vaccinarea cu preparatul viral atenuat sau inactivat, se sintetizeaza anticorpi din clasele IgM, IgA si IgG. Sinteza anticorpilor este indusa de marea majoritate a virusurilor,

altul, în functie de sediul multiplicarii, care la rândul sau conditioneaza manifestarile patologice ale infectiei.

În functie de mecanismul patogenezei, se disting trei tipuri de virusuri:

– virusurile care infecteaza *mucoasele tractului respirator si digestiv* si ramân la poarta de intrare: rinovirusuri, influenza, parainfluenza, virusul respirator sincitial, enterovirusuri;

– virusuri care infecteaza si se multiplica la nivelul *mucoaselor*, iar ulterior se *disemineaza* pe cale sanguina, limfatica sau axonala, pentru a infecta viscerele sau sistemul nervos central: virusul poliomielitei, rujeolic, al oreionului, herpes simplex, pox, virusul hepatitei A;

– virusuri *inoculate direct în sânge*, prin muscatura, întepatura, prin traume, iar de aici se raspândesc la organele tinta: HIV, virusul hepatitei B, virusul rabic, virusurile encefalitogene(alfa- si flavivirusuri).

Rolul anticorpilor în imunitatea antivirala

Cei mai importanti anticorpi cu rol protector antiviral sunt cei care au specificitate de combinare fata de *epitopii critici* ai suprafetei virionilor. Legarea anticorpilor cu virionul se face dupa modelul complementaritatii spatiale între epitopii antigenelor suprafetei virale si situsul de combinare al anticorpilor. Efectul principal al interactiunii anticorpilor cu particulele virale, în faza fluida, este *neutralizarea*, adica pierderea infectiozitatii virionilor. Pentru producerea efectului neutralizant, este necesara legarea mai multor molecule de anticorpi, care trebuie sa recunoasca o structura esentiala a virionului, denumita *situs critic*. De exemplu, fagii din seria T-par au un singur situs critic si infectiozitatea lor este anulata de legarea anticorpilor specifici la nivelul fibrelor cozii. Virionul gripal are situsuri critice multiple: anticorpii anti-HA sunt neutralizanti, cei specifici anti-NA au efect neutralizant minim, iar anticorpii anti-proteina M sunt total ineficienti.

La adenovirusuri, situsurile critice sunt *capsomerele hexonice si fibra pentonica*. Anticorpii specifici fata de aceste structuri sunt neutralizanti, iar anticorpii anti-penton nu diminua infectiozitatea. Pentru HIV, situsul critic este zona prin care virionul se ataseaza de moleculele CD_4 ale limfocitului Th. Anticorpii specifici fata de situsul de legare al virusului Epstein-Barr de receptorul pentru C3b al limfocitului B, au efect neutralizant.

Moleculele de anticorpi legate pe suprafata virionului învelit formeaza complexe, care, *in vivo* sau *in vitro*, initiaza fixarea complementului. Rezultatul final este *liza virionilor* înveliti.

Un alt efect al interactiunii anticorpilor cu virionii, *in vitro*, este *agregarea*. Fenomenul este dependent de un prag limita a densitatii virionilor/unitate de volum. Agregarea virionilor este însotita de *diminuarea infectiozitatii*, deoarece chiar în cazul unui mare exces al

moleculelor de anticorpi, unele particule virale din interiorul agregatului, ramân în afara contactului cu anticorpii neutralizanti si îsi pastreaza infectiozitatea, denumita *infectiozitate reziduala* sau *persistenta*. Agregarea virala fiind dependenta de un prag al densitatii virionilor, este un fenomen care se manifesta numai *in vitro*. *In vivo* nu se realizeaza niciodata o densitate limita a virionilor care sa produca acest efect.

Anticorpii antivirali ce se sintetizeaza în cursul raspunsului imun primar, au energie mica (afinitate) de legare cu situsurile antigenice ale virionilor si se disociaza usor, lasând o infectiozitate reziduala. Alteori, moleculele de anticorpi nu acopera situsurile critice ale virionilor, care conditioneaza initierea procesului infectios.

Efectul protector al anticorpilor circulanti este demonstrat pentru infectiile cu faza viremica, având o contributie esentiala la încheierea procesului infectios.

Anticorpii reduc încarcatura de virus si diminua infectiozitatea virala, consecinta fiind scaderea numarului de celule infectate, usurând astfel sarcina celulelor Tc de a elimina celulele infectate.

În cursul infectiei secundare, anticorpii se sintetizeaza rapid, la titru înalt.

Anticorpii se folosesc pentru profilaxia si terapia infectiilor virale. Imunizarea pasiva cu ser imun, diminua riscul infectiei virale si se foloseste în tratamentul infectiilor stabilizate.

Protectia mucoaselor. La nivelul mucoaselor, imunitatea antivirala este dependenta, în primul rând de IgA. Sinteza locala de anticorpi (în special IgA) dupa stimularea virala este relativ independenta de raspunsul imun sistemic. Anticorpii sintetizati la nivelul mucoaselor au efect protector, în absenta anticorpilor sistemici. Anticorpii din secretiile mucoaselor îndeplinesc doua functii majore fata de agentii patogeni virali: *excluderea imuna si neutralizarea infectiozitatii virale* .

Excluderea imuna este un mecanism protector foarte important la nivelul mucoasei respiratorii si pare a fi dependent nu numai de imunoglobuline, ci si de stratul de mucus care acopera epiteliul. Absenta activitatii ciliare este asociata cu infectii severe ale tractului superior, sugerând importanta barierei mucoase. sIgA neutralizeaza infectiozitatea virionilor, iar secretia mucoasa este în primul rând o bariera mecanica ce blocheaza adsorbtia virionilor pe membrana celulelor epiteliale.

IgA din secretii are rol esential în rezistenta la reinfectia cu virusurile care se multiplica exclusiv în celulele epiteliale ale mucoaselor digestive si respiratorii. Vaccinarea orala cu virus polio inactivat are ca scop stimularea imunitatii mucoasei. Daca au titru crescut, anticorpii serici (IgM) difuzeaza în mucoase. Nu se stie în ce masura anticorpii din secretii sau din sânge protejeaza epiteliul tractului respirator inferior.

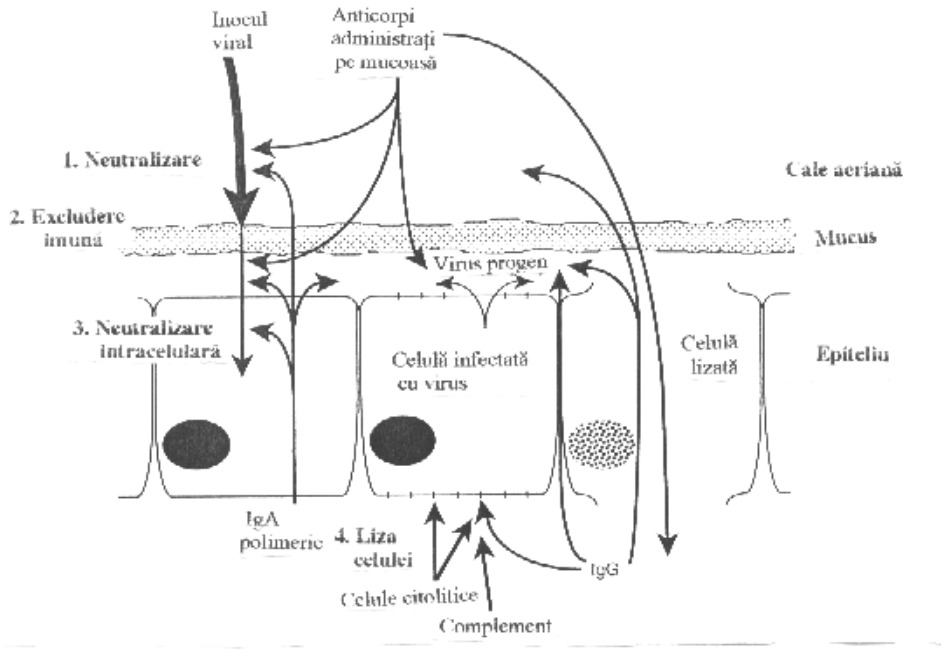


Fig. 94. *Mecanismele protectoare ale mucoasei tractului respirator*, fata de infectia virala. Dupa inoculare, particulele virale sunt *neutralizate* (1) de anticorpi, care ajung la suprafata mucoasei prin transport transepitelial (IgA polimeric), prin difuzie (IgG) sau prin administrare artificiala (picatura spray, aerosol). Alt mecanism este "*excluderea imuna*" (2) si se produce când particulele virale sunt legate de anticorpi, incluse în mucus si îndepartate prin activitate mucociliara. Anticorpii pot difuza prin mucus pentru a neutraliza virusul progen si particulele care trec prin stratul de mucus. Neutralizarea virala poate sa se produca *intracelular* (3), în timpul transportului intracelular al IgA polimeric. La suprafata bazolaterala a celulelor epiteliale infectate, IgG se poate fixa specific de proteinele membranare codificate de virus si mediaza *liza celulei* (4) dupa fixarea complementului sau prin fenomenul ADCC. Celulele infectate de virus pot fi lizate sub actiunea limfocitelor Tc specifice. Liza celulelor epiteliale usureaza trecerea efectorilor imunitari în ambele directii (dupa Weltzin, 1999).

În tractul respirator inferior, în secretia mucoasa, se gasesc concentratii mari de IgA si IgG. Anticorpii ajung în secretii, în mare parte, prin difuzia printre celule sau prin ruperi ale epiteliului.

Desi vaccinurile gripale se administreaza parenteral, este clar ca anticorpii din secretii (sIgA) au rol major în protectia antiinfectioasa. sIgA confera o mai buna protectie încrucisata fata de variante antigenice

rezultate prin drift antigenic, comparativ cu IgG circulant.

Pentru antigenele virale expuse pe suprafata celulelor infectate, studiile *in vitro* au evidentiat ca anticorpii antivirali si complementul se leaga specific si pot sa produca *citoliza*.

Complementul poate acoperi complexul Ag-Ac, blocând eventualii receptori disponibili. Complexele sunt fagocitate de celule care au receptori pentru C3.

Complementul poate liza virionii înveliti. Retravirusurile sunt lizate de complement, chiar în absenta anticorpilor. Complementul pare sa aiba rol în faza timpurie a infectiei, când titrul anticorpilor este foarte scazut si au afinitate mica.

Proteinele complementului sunt importante ca mecanism efector humoral fata de infectiile bacteriene, dar rezistenta celor cu deficit al complementului, fata de infectiile virale este normala.

Imunizarea pasiva a mucoasei respiratorii poate fi folosita în scop profilactic sau terapuetic. Are avantajul ca efectul protector este imediat, iar efectele colaterale sunt rare. Anticorpii sunt mai eficienti fata de infectiile virale, când se administreaza profilactic. Anticorpii administrati prin *imunizare pasiva*, în secretiile tractului respirator, pot sa previna, sa diminueze sau sa vindece infectile virale. Imunizarile s-au facut în special cu IgG pentru ca este mai usor de obtinut. IgA are avantajul de a fi polimeric si teoretic, are activitate aglutinanta superioara fata de IgG si pentru ca nu fixeaza complementul, probabil nu stimuleaza reactiile inflamatorii. Are o perioada de activitate mai lunga, deoarece componenta secretoare (CS) îl protejeaza de actiunea proteazelor.

În concluzie, imunitatea mediata humoral reprezinta modalitatea *tactica*, de neutralizare a virusurilor în faza extracelulara.

Anticorpii se sintetizeaza în raspunsul imun primar si secundar antiviral, dar activitatea lor protectoare este neesentiala pentru controlul multor infectii primare sau secundare. Copiii cu agamaglobulinemie înascuta de tip Bruton, nu au sensibilitate crescuta fata de infectiile virale, cu exceptia meningitei enterovirale, produsa de echovirusurile 9 sau 11. Anticorpii sunt activi fata de antigenele virale din umorile organismului, dar nu penetreaza în celulele infectate.

Imunitatea antivirala mediata celular

În ciclul infectios al multor virusuri, antigenele sunt expuse târziu pe suprafata celulei. In aceste cazuri, rolul protector al anticorpilor este secundar.

Imunitatea mediata celular (IMC) constituie mecanismul major al apararii specifice antivirale. Dupa infectia primara sau dupa administrarea vaccinului viral atenuat, se activeaza raspunsul celulelor Tc, care are activitate maxima la 7-10 zile si scade la 2-3 saptamâni

dupa infectie.

Pentru controlul infectiei virale, celulele Tc sunt esentiale. La pacientii cu sindrom Di George (cu aplazie timica congenitala), la pacientii SIDA, la cei leucemici sau la cei supusi terapiei imunosupresoare prelungite, frecventa si severitatea infectiilor virale cresc semnificativ.

Rolul IMC în protectia antivirala este elocvent în cazul infectiei cu virusul rujeolic. La copiii normali, infectia produce eruptia tegumentara caracteristica si ulterior virusul este eliminat. La copiii cu deficienta a celulelor T, boala este adeseori fatala. Manifestarile eruptive sunt mediate de celulele T si la copiii imunosupresati nu se produc. Aparitia eruptiei este indicatorul evolutiei favorabile. La copiii agamaglobulinemici, eruptia se produce si evolutia infectiei este nealterata de absenta anticorpilor. Se instaleaza imunitatea de memorie.

IMC precede sinteza anticorpilor în toate infectiile virale, dar în special în cazul infectiilor citolitice în care virusul se multiplica rapid. IMC are rol important în apararea fata de infectiile virale primare, deoarece se activeaza într-un timp scurt si raspunde nevoilor de aparare rapida fata de infectiile virale, înainte de edificarea raspunsului imun mediat humoral. In focarul inflamator indus de infectia virala se acumuleaza celule efectoare ale IMC, care ating valoarea maxima la doua zile de la începutul replicarii virale. IMC se activeaza dupa ce virusul a patruns în celula si aceasta expune pe suprafata ei, antigene virale. Efectul sau este *liza* celulelor infectate si are rolul de a limita diseminarea virusului în mediul extracelular. Liza celulelelor infectate cu virusuri citocide este protectoare numai daca se produce rapid, înainte de asamblarea virionilor progeni. Liza tardiva are efect opus, deoarece favorizeaza diseminarea virusului. Pentru virusurile care produc infectii persistente, citoliza timpurie sau tardiva are efect protector.

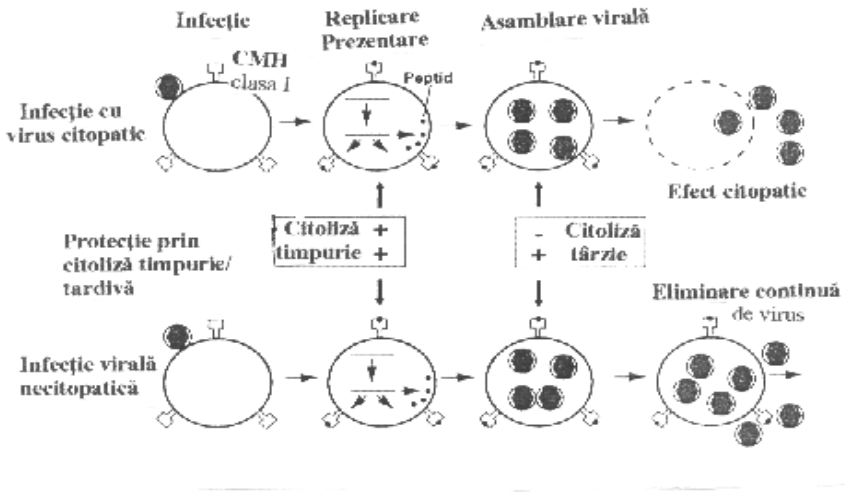


Fig. 95. Controlul *infectiilor virale citocide si necitocide* de catre celulele Tc. Liza celulei infectate poate sa se produca în faza de eclipsa, înainte de asamblarea virionilor maturi sau în faza de mijloc, când numai o parte a virionilor s-a asamblat. In ambele cazuri, liza este protectoare fata de infectia cu virusuri citocide si necitocide. In contrast, liza relativ târzie în timpul ciclului de replicare virala este protectoare numai fata de virusurile necitocide. Daca celulele Tc nu produc liza, celulele infectate pot sa supravietuiasca si sa elibereze virioni infectiosi perioade lungi de timp. In cazul infectiei citocide, liza tardiva nu diminua diseminarea virusului, deoarece asamblarea s-a încheiat si virionii vor fi eliberati prin citoliza produsa de efectorii imunitar (dupa Kagi, 1996).

IMC constituie modalitatea *strategica* de protectie antivirala, al carei efect este liza celulei înainte de încheierea ciclului de replicare virala.

Efectorii imunitatii mediate celular detecteaza celulele a caror suprafata este modificata din punct de vedere antigenic (celule infectate cu virus, celule transformate malign, celule îmbatrânite sau celule nonself).

Orice proteina structurala a virionului sau existenta numai în celula infectata (proteina nestructurala) poate fi prelucrata de celulele infectate sau de celulele accesorii ale raspunsului imun. Moleculele nonself prelucrate sunt asociate cu moleculele CMH I (sau CMH II) si sunt expuse pe suprafata celulei. Complexele moleculare devin tinte pentru actiunea limfocitelor Tc. Celula infectata este lizata sub actiunea factorilor litici eliberati de limfocitul Tc. Celulele Tc recunosc orice proteina virala, structurala sau nestructurala, asociata cu moleculele CMH.

Limfocitele Tc activate sunt specifice fata de virusul infectant. De exemplu, limfocitele Tc sensibilizate fata de virusul variolei, lizeaza numai celulele infectate cu acest virus. Nu lizeaza celulele normale si nici celule alogenice infectate cu virusul variolei.

Zinckernagel si Doherty (1974) au demonstrat experimental specificitatea actiunii limfocitelor fata de antigenele virale, dar si fenomenul de limitare (restrictie) a interactiunilor celulei efectoare cu celula tinta, de identitatea moleculelor CMH. Celulele care prezinta antigenul si cele care îl recunosc trebuie sa fie histocompatibile, adica sa poarte pe suprafata lor, molecule CMH I si II identice.

În infectia secundara, raspunsul celulelor Tc este rapid, mediat de celulele Tc de memorie. Celulele de memorie pot sa persiste în absenta antigenului specific, probabil datorita stimularii sporadice nespecifice, de citochinele eliberate local în timpul reactiilor fata de antigenele neînrudite.

Celulele NK nu au specificitate fata de antigen si nu produc memorie imunitara. Celulele NK se activeaza rapid si la 2-3 zile dupa infectie ating activitatea maxima, dupa care diminua rapid. Deficientele pentru celulele NK sunt rare, dar sunt însotite de infectii severe cu virusul varicela zoster, cu virusul citomegalic, herpes simplex virus 1.

Mecanismul interactiunii celulei NK cu celula infectata nu se cunoaste. Celulele NK lizeaza celulele care au pierdut moleculele CMH si astfel au devenit anormale. Activitatea celulelor NK este stimulata de interferon.

Celulele infectate cu virusuri pot fi lizate prin *fenomenul ADCC* (*a*ntibody *d*ependent *c*ell *c*itoxicity), prin actiunea limfocitelor Tc sau NK. Ele lizeaza celulele tapetate cu anticorpi.

Fagocitele mononucleare (monocitul sanguin, macrofagul tisular, celula dendritica) au rol important pentru eliminarea virusului dintr-un proces infectios. Fagocitele mononucleare fagociteaza virionii inoculati prin întepatura. Macrofagele au si activitate ADCC.

Mecanisme prin care celulele infectate evita efectorii raspunsului imun

În mediul extern, virusurile sunt instabile, datorita sensibilitatii la factorii de mediu. De aceea, pentru a se perpetua într-o populatie de organisme sensibile, virusul trebuie sa ramâna cât mai mult în gazda infectata, ori sa se transmita cât mai eficient de la o gazda la alta. Pe de alta parte, efectorii raspunsului imun humoral si celular nu sunt totdeauna eficienti în recunoasterea si eliminarea celulelor infectate cu virus, iar virusul eliberat din celula, trebuie sa evite contactul cu efectorii

raspunsului imun.

În majoritatea *infectiilor persistente*, virusurile infecteaza celulele sistemului imunitar: virusul hepatitei B, papovavirus, herpes, virusul Epstein-Barr, virusul citomegalic, rubela, rujeola, oreion, influenza, parainfluenza, HTLV I, II, HIV, diminuând potentialul reactiv al imunitatii.

O celula infectata care expune pe suprafata ei un numar mic de situsuri antigenice poate sa scape lizei, deoarece situsurile antigenice distantate nu permit legarea celor doua situsuri de combinare ale moleculei de anticorp, necesara activarii complementului. Celulele infectate persistent exprima o cantitate limitata de antigene virale pe suprafata lor, comparativ cu celulele în care ciclul de replicare virala este litic. Acesta pare a fi mecanismul de supravietuire a celulelor infectate cu virusul coriomeningitei limfocitare (LCM), cu virusul rujeolei sau cu virusul hepatitei B.

Antigenele virusului hepatitei B se sintetizeaza în mare exces si se elimina din hepatocite, sub forma unor particule fara genom. Se considera ca excesul cantitativ de antigene virale determina fenomenul de *toleranta imunitara*.

Celulele infectate persistent manifesta fenomenul de *fluctuatie cantitativa* a antigenului viral, expus pe suprafata lor. Celulele infectate cu virusul rujeolic trec succesiv prin cicluri de disparitie si reaparitie a antigenelor virale, asociate membranei citoplasmatice, în timp ce moleculele normale ale celulei nu au variatii cantitative semnificative. Fenomenul se numeste *modulatie antigenica.*

Anticorpii necitolitici pot masca antigenele virale expuse la suprafata celulei, devenind astfel inaccesibile celulelor efectoare litice (limfocite Tc, NK).

Uneori, virusurile infecteaza *celule care nu exprima molecule CMH I*. Neuronii exprima putin sau de loc moleculele CMH I si reprezinta un situs preferential al persistentei virale. Herpesvirusurile infecteaza latent neuronii, iar virusul rujeolic, virusul LCM si alfavirusurile pot infecta aceste celule.

Adenovirusurile codifica o proteina de 19 kD, care se asociaza cu moleculele CMH I si blocheaza transportul lor spre suprafata celulei si astfel celula infectata care nu exprima molecule CMH I nu este recunoscuta de limfocitele T.

Virusul influenza evita efectul neutralizant al anticorpilor specifici, prin rata înalta de mutatie a ARN-polimerazei, generând noi variante biochimice ale hemaglutininei (HA) si într-o masura limitata, ale neuraminidazei (NA). Noile variante antigenice ale HA si NA trebuie sa-si pastreze functia, adica virionul trebuie sa fie infectios, dar scapa detectarii de anticorpii preexistenti. Fenomenul variatiei antigenice

limitate se numeste *drift antigenic*.

Shiftul antigenic corespunde unei noi variante genetice a virusului influenza si este rezultatul unei reasortari a genomului, care are loc cel mai probabil la pasari, unde se produce co-infectia cu un virus uman (ce infecteaza rareori pasarile) si cu o linie de virus aviar.

Virusurile contracareaza actiunea *citochinelor*. Virusurile sunt atât inductori ai sintezei interferonilor (IFN), cât si tinta principala a actiunii lor. Un virus care induce sinteza IFN si este foarte sensibil la actiunea sa inhibitorie nu se poate propaga. Evolutia a favorizat virusurile care contracareaza efectele inhibitorii ale IFN asupra ciclului de replicare virala. Virusurile cu virulenta înalta, inhiba sinteza ARN celular si sinteza proteinelor (efect de întrerupere), ceea ce interfera cu capacitatea celulei de a produce IFN si de a raspunde la actiunea lui.

Multe virusuri sunt rezistente la actiunea IFN. Unele dezoxiribovirusuri codifica proteine ce inhiba caile majore de transducere a semnalelor induse de IFN. De exemplu, proteina E_1 a adenovirusurilor inhiba semnalul indus de IFN α, β sau γ. Poxvirusurile codifica sinteza unor receptori solubili pentru citochine (pentru TNF si IL-1), denumiti *virochine*.

Tipurile de imunitate dobândita (adaptativa)

Homeostazia organismului uman si animal este asigurata de sisteme complexe de aparare, ale caror particularitati functionale au fost definite în primul rând, în raport cu modul de actiune fata de agentii infectiosi. Organismele dispun de doua categorii de mecanisme de aparare:

– mecanisme de aparare *specifica*, reprezentate de sistemul imunitar;

– mecanisme de aparare *nespecifica* sau *înascuta*, adica cele care asigura rezistenta sau imunitatea naturala.

Prin imunitate “naturala” sau *înascuta* se întelege rezistenta unui organism fata de un agent infectios sau fata de un parazit, în absenta unui raspuns imun evident.

Cele doua sisteme de aparare, specifica si nespecifica, se conditioneaza reciproc. Nu se poate evalua gradul în care mecanismele de rezistenta naturala sunt influentate dupa expunerea la contactul cu agentii infectiosi, dar raspunsul imun detectabil sau chiar subliminal produce modificari ale starii de activitate a sistemului fagocitar

mononuclear si a celulelor killer.

Mecanismele de aparare antiinfectioasa sunt atât specifice (adaptative, dobândite) cât si nespecifice (înascute).

Imunitatea dobândita are un caracter specific si se defineste ca o stare de rezistenta antiinfectioasa, cu caracter individual, conditionata de contactul anterior al organismului, într-un proces infectios natural, cu agentul infectios virulent, cu toxinele sale native sau cu agentul atenuat si anatoxinele sale administrate ca *vaccin*. Imunitatea dobândita, denumita si *inductibila,* este relativa, în sensul ca, desi în general este foarte solida, poate fi învinsa prin agresiunea exercitata de o cantitate mare de agenti infectiosi sau de infectia cu o tulpina deosebit de virulenta.

În functie de originea si modul de instalare, imunitatea dobândita este de doua tipuri: dobândita pe cale *naturala* si pe cale *artificiala*. In ambele cazuri, imunitatea poate fi dobândita atât *activ*, prin raspunsul imun la stimulul antigenic, cât si *pasiv*, prin transferul de anticorpi exogeni.

Imunitatea dobândita natural activ se instaleaza dupa trecerea organismului printr-o stare de infectie aparenta (decelabila clinic) sau inaparenta. Durata starii de imunitate este variabila. Trecerea prin unele infectii asigura o protectie specifica pentru tot restul vietii (rujeola, variola, varicela, oreionul). Alte infectii (difteria, scarlatina, tusea convulsiva etc.) confera o protectie mai putin solida, astfel încât la o noua expunere(dupa câtiva ani), organismul poate face din nou boala într-o forma mai usoara decât prima îmbolnavire.

Imunitatea dobândita natural pasiv este rezultatul transferului transplacentar si prin secretia lactata, al anticorpilor de la mama la fat. Aceasta forma de imunitate este variabila din punct de vedere cantitativ si calitativ, în functie de complexitatea structurala a barierei placentare si diversitatea antigenelor la care a fost expus organismul matern. Trecerea imunoglobulinelor prin filtrul placentar depinde de structura placentei, adica de numarul de straturi celulare ce se interpun între circulatia materna si cea fetala. Tranzitul anticorpilor este restrictiv la speciile de bovine, cabaline, porcine, canine, care au placenta de tip *epiteliocorial*, cu 4 straturi tisulare: endoteliul capilar matern, epiteliul corionic, tesutul conjunctiv fetal, endoteliul capilar fetal. Nou-nascutul este protejat de imunoglobulinele din colostru. In primele 24 de ore, aparatul gastrointestinal este imatur din punct de vedere functional si digestia proteica nu are loc. Imunoglobulinele din colostru ramân intacte si sunt transportate în mediul intern prin celulele epiteliului intestinal. Transferul placentar al imunoglobulinelor este foarte intens la speciile cu placenta *hemocoriala* (om, maimute, rozatoare), la care stratul

endoteliului capilar matern lipseste si sângele matern scalda tesutul placentar fetal. Nou-nascutul uman primeste anticorpi materni si dupa nastere, prin colostrul bogat în imunoglobuline, provenite din circulatia materna.

Imunitatea dobândita natural si pasiv asigura noului nascut o stare de nereceptivitate fata de agentii infectiosi pentru care organismul matern este imun. Aceasta imunitate scade treptat dupa nastere, pe masura catabolismului anticorpilor de origine materna, astfel încât, dupa o perioada de 3-6 luni copilul devine sensibil fata de agentii infectiosi. Imunitatea transplacentara explica raritatea maladiilor infectioase la copii, în primele luni de viata.

Imunitatea dobândita artificial activ

Imunitatea dobândita artificial activ este consecutiva administrarii *vaccinurilor*. Denumirea de *vaccin* vine vine de la cuvântul latin *vaca* si semnifica originea primului preparat pe care E. Jenner (1798) l-a utilizat pentru controlul variolei.

Vaccinuri

Vaccinurile sunt produse biologice care contin bacterii vii cu virulenta atenuata, bacterii omorâte, toxine modificate (anatoxine), virusuri infectioase dar cu virulenta atenuata, respectiv virusuri inactivate si care, introduse pe o cale adecvata în organismul uman sau animal, stimuleaza reactivitatea imunitara, generând o stare de protectie temporara fata de agentul infectios din care au fost preparate.

Preparatul vaccinal trebuie sa fie *eficient*, adica sa induca un raspuns imun protector, a carui memorie sa se pastreze în timp si, pe de alta parte, sa prezinte un grad înalt de *siguranta*, adica sa nu determine efecte secundare defavorabile.

Administrarea unui vaccin se face pe baza unei strategii bine definita. Scopul vaccinarii poate fi *eradicarea, eliminarea* sau *limitarea* unui proces infectios.

Eradicarea semnifica disparitia agentului patogen, consecutiv actiunii de vaccinare.

Eliminarea corespunde disparitiei manifestarilor patologice, desi agentul patogen se pastreaza în populatia umana sau animala.

Limitarea semnifica posibilitatea controlului unei maladii infectioase pâna la un nivel la care nu mai reprezinta o problema de

sanatate publica.

În general, vaccinurile se administreaza *înainte* de a se produce infectia cu tulpina salbatica a agentului patogen. Face exceptie vaccinul rabic, care se administreaza dupa ce s-a produs o presupusa infectie. Faptul este posibil, deoarece infectia rabica are o perioada lunga de incubatie si permite ca preparatul vaccinal sa induca un raspuns imun eficient, care modifica evolutia infectiei cu o tulpina de virus "de strada".

Dupa continutul lor, vaccinurile pot fi *monovalente*, adica includ antigenele unei singure tulpini bacteriene sau virale (de exemplu, vaccinul stafilococic), *bi-, tri- sau polivalente*, care contin antigene provenind de la doua, trei sau mai multe specii de microorganisme sau tulpini virale (de exemplu, vaccinul diftero-tetano-pertusis).

Dupa provenienta agentilor patogeni utilizati la prepararea unui vaccin, se disting *autovaccinuri* si *stocvaccinuri*. Autovaccinul este vaccinul preparat cu o tulpina a unui microorganism sau a unui virus, izolata de la un bolnav si destinat a fi folosit numai pentru vaccinarea pacientului de la care s-a facut izolarea. Stocvaccinurile se obtin din amestecul mai multor tulpini de agenti infectiosi si sunt destinate imunizarii întregii populatii susceptibile.

Vaccinuri de origine bacteriana

Vaccinurile vii constau din suspensii de bacterii vii, dar cu virulenta atenuata, astfel încât sa nu determine o infectie aparenta, dar sa ramâna capabile sa initieze un proces infectios inaparent, cu efect imunizant. Vaccinurile vii contin celule viabile, slab virulente si care, dupa administrare, induc o imunitate solida, comparabila celei consecutive trecerii prin boala, dar produc cel mult semne minime de îmbolnavire. Indiferent de locul inoculării, agentul infectios din vaccinul viu nu ramâne localizat, ci se raspândeste în organism, patrunzând si multiplicându-se în aceleasi tesuturi în care se localizeaza si în cazul infectiei naturale, dar infectând un numar mic de celule sensibile si multiplicându-se lent, agentul infectios din vaccin nu declanseaza o boala clinica, ci numai o infectie de forma atenuata, care este însotita de modificari umorale si de reactivitate imunitara.

Pentru prepararea vaccinurilor vii se utilizeaza mutante bacteriene cu *virulenta atenuata*, selectionate prin cultivarea unor tulpini salbatice în conditii speciale: de exemplu, cultivarea la o temperatura superioara celei optime în cazul bacilului carbunos – *Bacillus anthracis*, sau prin actiunea unor substante chimice si utilizarea unor medii de cultivare

care ofera conditii nefavorabile (vaccinul BCG).

Vaccinurile omorâte constau din suspensii bacteriene omorâte prin încalzire la temperaturi ridicate (60^{o}), ori sub actiunea formolului sau a fenolului si care contin una din aceste substante ca prezervant. Din aceasta categorie fac parte vaccinul tifo-paratific A si B (TAB), vaccinul pertusis (din *Bordetella pertusis*), vaccinul stafilococic. Proprietatile imunogene ale vaccinurilor bacteriene omorâte se mentin intacte.

Anatoxinele (toxoizii) sunt preparate biologice cu proprietati imnogene, derivate din toxine. Uneori, toxinele se transforma spontan în derivati lipsiti de toxicitate, dar pastreaza proprietatile de imunogenitate si specificitate ale toxinei native. Mecanismul molecular al inactivarii toxinelor nu este cunoscut. Inactivarea este un proces lent si progresiv, dependent de pH, temperatura, prezenta ionilor sau a proteinelor contaminante, de procesul învechirii preparatului. Un factor major al inactivarii pare a fi *proteoliza partiala* a moleculelor de toxina sub actiunea proteazelor contaminante, dar si schimbarea conformatiei moleculei, polimerizarea sau clivarea unui fragment molecular pot actiona în acelasi sens.

Inactivarea toxinelor si transformarea lor în produse atoxice are loc în conditii dirijate, sub actiunea formolului 4%$_{o}$, la 37^{o} si rezulta *anatoxine*. Fenomenul a fost descoperit de Ramon (1925). Beta-propiolactona, 2-4-dinitrofluorbenzenul si glutaraldehida au aceleasi efecte asupra toxinelor.

Pentru a fi utilizata ca vaccin, o anatoxina trebuie sa îndeplineasca urmatoarele conditii: a) sa fie imunogena si sa induca sinteza anticorpilor la un titru suficient pentru a neutraliza *in vivo*, toxina nativa; b) sa fie complet lipsita de toxicitate; c) sa nu aiba proprietati alergizante. Anatoxina ideala ar putea fi produsa de microorganisme manipulate genetic sau prin mutatii ale genei codificatoare a toxinei. Ea ar fi o proteina netoxica, dar cu aceleasi proprietati de imunogenitate cu ale toxinei native, capabila sa induca sinteza anticorpilor neutralizanti.

Conditiile optime pentru obtinerea anatoxinelor sunt proprii fiecarei toxine si au fost optimizate empiric, dar mecanismele moleculare ale inactivarii nu se cunosc. În general, conditiile optime pentru obtinerea anatoxinelor sunt urmatoarele:

– concentratia proteica trebuie sa fie de 1 mg/ml, iar cea de formol, de 1,3 mg/ml;

– temperatura de detoxifiere este de 37-40 ^{o};

– pH-ul optim este de 7,8-8,2 pentru toxinele difterica si tetanica si 5,5 pentru cea botulinica;

– durata contactului cu formolul este de 3-5 saptamâni.

Detoxifierea începe simultan cu adaugarea formolului. Procesul de detoxifiere este evident dupa un minut si creste exponential timp de 24 de ore, când toxicitatea are valoare foarte scazuta si tinde spre 0, la 5 zile. Forma netoxica poate reveni total sau partial la forma toxica. De aceea este necesara prelungirea contactului cu formolul, o perioada mai lunga de timp. Molecula de anatoxina are o structura stabilizata, prin formarea legaturilor noi între formol si resturile de aminoacil, dar în acelasi timp, prin actiune prelungita, formolul are rolul unui *agent de reticulare* pentru ca favorizeaza formarea legaturilor între moleculele proteice identice, ceea ce explica polimerizarea unor anatoxine.

Anatoxinele bacteriene, ca si exotoxinele sunt foarte imunogene pentru om, cal, capra, iepure, cobai, în special dupa asocierea cu adjuvanti (fosfat de Ca). Ele se pot administra ca vaccinuri pentru imunizarea activa sau se folosesc pentru imunizarea animalelor în vederea obtinerii serurilor imune utilizabile în seroterapie.

Vaccinuri virale

Vaccinurile virale sunt de trei categorii:
1) Vaccinuri cu virus activ (infectios) atenuat;
2) Vaccinuri cu virus inactivat (neinfectios).
Ambele categorii sunt *vaccinuri unitare.*
3) Vaccinuri subunitare.

Vaccinuri unitare

Vaccinurile cu virus atenuat se obtin din tulpinile virale atenuate, lipsite complet sau aproape complet de patogenitate, dar îsi pastreaza capacitatea de a induce un raspuns imun protector. Fiind infectioase, ele se multiplica în organismul vaccinat si produc o stimulare antigenica continua, într-un interval de timp.

Vaccinarea cu virusuri atenuate confera o imunitate de durata, dupa administrarea unei singure doze.

Atenuarea virusurilor se obtine pe mai multe cai.

1) Utilizarea pentru vaccinare, a unui virus înrudit, de la o alta gazda. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, l798), utilizat în controlul variolei, este virusul vaccinal, recoltat din leziunile pustulare de pe ugerul vacii. Virusul vaccinal imunizeaza încrucisat cu virusul variolei (smallpox) si este protector fata de infectia variolica.

Virusul rujeolei imunizeaza câinele fata de virusul bolii Carré.

Anticorpii fata de virusul rujeolei neutralizeaza virusul bolii Carré, dar nu si invers.

Calea de abordare a lui Jenner pentru obtinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosita si astazi. Ea implica izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la pasari, înrudite antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) *in vitro*, echivaleaza cu procesul atenuarii. Celulele diploide umane reprezinta un substrat semipermisiv pentru virusurile umane si mamaliene si adeseori, multiplicarea lor este lipsita de eficienta.

Genele virusurilor mamaliene si aviare, care determina spectrul de gazda au o mare diversitate a secventelor de nucleotide, fata de genele corespunzatoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasica a lui Jenner, trebuie sa se sprijine pe tehnicile de genetica virala, biologie moleculara si imunologie.

2) Inocularea virusului patogen sau partial atenuat, pe o cale "nenaturala", adica alta decât cea prin care virusul patrunde în mod obisnuit în organism. Metoda este folosita pentru vaccinarea animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei pasarilor, se administreaza prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseste, deoarece riscul infectiei este mare.

3) Pasajul virusului de origine umana într-un substrat "nenatural", *in vivo* sau *in vitro*. Cele mai importante vaccinuri pentru om si animale s-au obtinut pe aceasta cale. Virusul se cultiva în mod repetat, prin inoculare la organisme sanatoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la soarece si apoi în embrionul de gaina; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuta; virusul rujeolei – în fibroblaste de embrion de gaina. Pasajul într-un substrat celular "nenatural", selectioneaza mutante printr-un cumul de evenimente mutationale întâmplatoare. In practica vaccinarii, se utilizeaza cele cu proprietati adecvate de atenuare si imunogenitate. Mutantele care dupa administrare ramân localizate la poarta de intrare, sunt cele mai utile. Unul din marile succese ale acestei metode de atenuare este vaccinul *polio*. Prin pasaje succesive în culturile celulare de rinichi de maimuta, s-a selectat o linie lipsita de neurovirulenta, dupa inocularea intracerebrala sau intraspinala la maimuta. Vaccinul rubeolic s-a obtinut prin cultivarea virusului pe acelasi substrat, iar liniile folosite ca vaccin rujeolic si al febrei galbene s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de gaina.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivaleaza cu o infectie usoara, asimptomatica.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimularii ambelor compartimente ale raspunsului imun: celular si humoral, atât

sistemic cât si local. Acest fapt este deosebit de important pentru infectiile virale în care imunitatea mediata celular are un rol esential în eliminarea virusului, cât si pentru infectiile mucoaselor, în care atât imunitatea locala cât si cea sistemica, sunt necesare pentru rezistenta optima.

Vaccinurile virale atenuate stimuleaza raspunsul imun fata de fiecare din antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusa de aceste vaccinuri este mai durabila, mai eficienta si are un spectru mai larg de reactivitate încrucisata, decât cea indusa de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucisata este foarte importanta pentru virusurile care sufera variatie antigenica progresiva.

Virusurile atenuate din vaccinuri, pastrându-si capacitatea de multiplicare în organismul vaccinat, se raspândesc în populatie si imunizeaza chiar indivizi nevaccinati.

Vaccinurile atenuate se produc cu un pret de cost mai scazut si se administreaza mai usor. In cazul vaccinului polio, o singura doza administrata oral este suficienta pentru a crea o buna stare de protectie.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminarii* cu agenti infectiosi supraadaugati. De exemplu, loturile initiale de vaccin polio, au fost contaminate cu SV_{40}, din celulele de rinichi de maimuta, dar nu s-a constatat cresterea incidentei tumorilor la copiii vaccinati. Vaccinul atenuat al virusului febrei galbene, multiplicat în fibroblastele de embrion de gaina, a fost contaminat initial cu virusul leucozei aviare.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolic, al febrei galbene) pastreaza un nivel scazut de *virulenta reziduala,* care determina infectii la copiii cu imunodeficiente.

O problema importanta, legata de infectiozitatea vaccinurilor atenuate, este aceea a *restaurarii* unui grad variabil de virulenta dupa vaccinare, care determina infectii cu manifestari clinice la copiii imunodeficienti. Procesul infectios nu este consecinta alterarii genetice a virusului din vaccin. Din aceasta cauza, vaccinul nu se administreaza gravidelor.

Vaccinurile atenuate ridica problema *instabilitatii genetice.* Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variatiile termice si de aceea necesita un regim termic constant ($+4^{o}$), pe toata durata depozitarii.

Un alt dezavantaj consta în faptul ca virusul atenuat poate sa produca o infectie persistenta. De asemenea, administrarea vaccinului atenuat poate sa interfere cu virusul de tip salbatic care infecteaza natural si sa domine pâna la anulare eficienta vaccinarii. De exemplu, virusul polio atenuat, se administreaza pe cale orala, dar poate sa

interfere cu o larga varietate de enterovirusuri.

Vaccinurile inactivate contin virioni care, dupa tratamentul cu agentul chimic inactivant nu pot sa initieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obtine prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de gaina (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuta (virusul polio), sau în fibroblastele umane de embrion de gaina (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactiveaza cu formol, acetil-etilenimina sau cu beta-propiolactona.

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au avantajul riscului minim al infectiei. Rareori, preparatele inactivate contin virus infectios rezidual, care a rezistat tratamentului de inactivare, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate au câteva dezavantaje. Uneori, tratamentul cu un agent chimic anuleaza imunogenitatea unor proteine virale, astfel încât raspunsul imun fata de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anuleaza imunogenitatea proteinei de fuziune (F), iar vaccinul îsi pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate *nu stimuleaza imunitatea mediata celular* (mediata de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus si în rezistenta la infectiile cu o gama larga de virusuri.

Pretul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obtin din virusul rabic cultivat în CDU si în embrionul de rata, din virusul oreionului si din virusul influenza, cultivate în embrionul de gaina, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuta. Toate sunt inactivate cu beta-propiolactona sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recenta, dar este foarte costisitor pentru ca virusul nu se cultiva în sisteme celulare *in vitro,* iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacientilor infectati cronic sunt foarte laborioase.

Vaccinuri subunitare

Initial, vaccinurile s-au obtinut din preparatele brute de virus, dupa multiplicarea lor într-un tesut *(in vivo)* sau în culturi celulare. Pe masura ce a fost posibila obtinerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuarii toxicitatii vaccinului, s-a trecut la purificarea virusului si a unor componente virale.

Vaccinurile subunitare contin *proteine virale* în care se gasesc localizate situsuri antigenice majore si care se pot substitui virionilor în

practica vaccinarii. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar contine antigenele de suprafata HA si NA. Preparatul este mai putin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai putin eficient în stimularea raspunsului imun.

Celulele mamaliene reprezinta un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultura se infecteaza cu virus si din lizatele celulare se purifica antigene proteice. În lizate se gaseste o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obtinerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridica probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Daca se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepartat ADN celular, potential oncogen.

Tehnici moderne de obtinere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare si cunoasterea mecanismelor raspunsului imun, a stimulat preocuparile privind obtinerea unor vaccinuri noi. Utilizarea anticorpilor monoclonali a facut posibila identificarea epitopior cu rol esential în stimularea raspunsului imun, iar genele codificatoare ale antigenelor, au fost clonate prin tehnicile de inginerie genica.

Genele codificatoare ale antigenelor protectoare, se pot izola dupa fragmentarea genomului sub actiunea catalitica a enzimelor de restrictie. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se insera în celula procariota *(E. coli*, *B. subtilis),* sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restrictie este posibila numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc si ulterior poate fi utilizat în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitiva este adecvat scopului clonarii, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativa.

Celulele de mamifere reprezinta substratul optim pentru clonarea genelor si pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular si prelucrarea proteinelor sunt asemanatoare celor ce au loc în celula infectata de virusul natural. Celulele produc cantitati mari de antigen viral, codificate de gena clonata.

Tehnicile de clonare genica se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplica *in vitro,* în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserata într-o plasmida si clonata de levuri. Proteina virala este neglicozilata, dar este imunogena pentru om si induce sinteza anticorpilor protectori fata

infectia naturala. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincitial).

Pentru purificarea glicoproteinelor virale din celulele infectate în care a fost clonata gena, s-a folosit *tehnica cromatografiei de afinitate cu anticorpi monoclonali* sau alte tehnici de separare (cromatografia cu lectine, tehnici de separare fizica).

ADN viral este functional chiar în celula procariota, dupa transferul prin intermediul unui vector (plasmida sau fag). Astfel s-au sintetizat antigene de poliovirus, antigenul HBs, antigenul virusului hepatitei A, HA si NA ale virusului gripal.

O varianta a tehnicilor de ADN recombinant este aceea de obtinere a vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid.* Genomul poxvirusurilor codifica circa 200 de proteine. Unele sunt esentiale pentru multiplicarea virala, dar un interes deosebit prezinta genele neesentiale pentru ciclul de multiplicare. Ele reprezinta circa 30% din genom si sunt grupate la extremitatile genomului ADN dublu catenar linear. In plus, genomul este împachetat lax în virion. Aceste particularitati au permis obtinerea, prin tehnicile de inginerie genica, a *poxvirusurilor recombinate,* infectioase, capabile sa exprime genele straine inserate în genomul lor.

ADN viral este inserat în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vccinal hibrid se multiplica în celulele permisive si genele inserate în genomul sau codifica antigenul HBs, antigenul rabic, antigenul HSV etc.

Vaccinurile virale hibride sunt stabile si stimuleaza ambele compartimente ale raspunsului imun.

O alta cale de producere a vaccinurilor virale atenuate, genetic stabile, implica obtinerea *mutantelor de deletie*. Acestea au o capacitate diminuata de multiplicare, ceea ce *echivaleaza cu atenuarea.* Mutantele prin deletie trebuie sa-si pastreze infectiozitatea si imunogenitatea si sa fie stabile genetic.

Antigene peptidice sintetice. Producerea si utilizarea antigenelor sintetice s-au impus dupa demonstrarea bazelor moleculare ale imunogenitatii si dupa studiile privind proprietatile imunogene ale antigenelor artificiale. Pe de alta parte, s-a demonstrat ca macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor si a microorganismelor infectioase, au un numar mare de determinanti antigenici, dar numai un numar limitat dintre acestia au semnificatie imunogena si un numar foarte mic sunt inductori ai raspunsului imun protector.

Sinteza artificiala a peptidelor a devenit posibila dupa introducerea metodelor de secventiere a ADN. Cunoasterea secventei bazelor a permis dirijarea secventei de aminoacizi a proteinelor cu activitate

biologica.

Vaccinurile sintetice contin secvente polipeptidice sintetizate pe cale chimica. Ele includ determinanti antigenici esentiali pentru inducerea unui raspuns imun protector fata de agentii patogeni corespunzatori.

Conditia esentiala pentru obtinerea vaccinurilor sintetice este cunoasterea structurii chimice a determinantilor antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) si identificarea regiunilor imuno-dominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichida, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinica. De exemplu, s-a determinat structura tridimensionala a hemaglutininei virusului gripal si s-au identificat *regiunile calde ale moleculei,* care, cu mare probabilitate, corespund determinantilor antigenici. S-a stabilit secventa aminoacizilor, care a fost reprodusa în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvente scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primara a moleculei proteice. Dezavantajul major este ca secventele sintetice nu reproduc configuratia spatiala a determinantilor antigenici naturali, în special a celor discontinui. Acestia sunt alcatuiti din resturi de aminoacizi neadiacenti în structura primara a moleculei, dar pot fi juxtapusi în structura tridimensionala a proteinei pliate. Astfel se explica slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calitatilor de imunogenitate ale peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemanare a conformatiei lor, cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o molecula purtator, pentru cresterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de *Megathura* (KHL), cuplata prin intermediul glutaraldehidei sau a unei grupari tiol a unui rest de cisteina, adaugat la o extremitate a secventei sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvente de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficiente imunoprotectoare, precum si peptide care reproduc unele secvente ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul ca nu contin alte componente care ar putea produce efecte secundare si stimuleaza raspunsul imun strict specific fata de epitopii antigenici critici ai agentului infectios. Sunt stabile indefinit si se produc la un pret de cost scazut. Au însa dezavantajul major de a nu stimula raspunsul imun mediat celular.

Vaccinurile care contin virioni inactivati si anatoxinele se administreaza, în general, pe cale *parenterala* (subcutan, intradermic, intramuscular), în mod obisnuit în trei injectii separate la intervale de 5, 7 si respectiv 21 de zile.

Vaccinurile bacteriene vii si cele virale atenuate se administreaza într-o singura doza, în general, pe cale *parenterala.* Vaccinul BCG, ca si vaccinul polio infectios atenuat, la nou nascuti se administreaza pe cale *orala.*

Imunitatea consecutiva vaccinarii se instaleaza relativ lent, la circa 15-20 de zile de la ultima injectie si are o durata variabila de la un vaccin la altul (în general, între 1 si 7 ani), scazând treptat pâna la disparitia completa. Vaccinarea primara, ca si infectia, confera organismului o stare speciala de reactivitate imunitara - *memoria imunitara* - gratie careia, orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturala(infectie si boala) sau pe cale artificiala(prin vaccinare) declanseaza o “redesteptare” rapida a imunitatii, care se manifesta cu o intensitate mai mare decât aceea a raspunsului imun postvaccinal. Cea de a II-a administrare a vaccinului declanseaza o reactie anamnestica (de memorie), cu o crestere brusca si masiva a titrului anticorpilor.

Desi în general este solida, imunitatea postvaccinala este relativa, în sensul ca unele persoane vaccinate pot totusi sa faca boala într-o forma mai usoara, mai ales consecutiv unei infectii masive cu un agent patogen deosebit de virulent.

Datorita faptului ca se instaleaza lent, imunizarea prin vaccinare se foloseste în scop profilactic pentru a evita riscul infectiei cu un agent patogen.

Imunizarea dobândita artificial pasiv

Serurile imune sau terapeutice sunt produse biologice obtinute din serul sanguin al unui animal imunizat prin vaccinare sau din serul unui convalescent imunizat prin infectie naturala sau prin vaccinare. Serul imun contine anticorpi specifici, capabili sa neutralizeze actiunea antigenului corespunzator. Primele încercari de folosire a serurilor în terapeutica dateaza din 1888, când Richet si Hericourt au demonstrat ca inocularea organismelor animale cu agenti patogeni, determina aparitia în ser a anticorpilor, cu efect protector nu numai pentru organismul care i-a sintetizat, dar si pentru organismele carora li se injecteaza serul imun.

În general, serurile imune se prepara pe animale mari (cal), care sunt hiperimunizate, dupa principiile imunizarii active, cu doze repetate

crescânde de celule, virioni, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obtinut prin sângerarea animalelor imunizate este inactivat si tratat cu fenol (ca prezervant), controlat pentru *sterilitate, inocuitate* (lipsa de nocivitate) si pentru *eficacitate* (titrul de anticorpi). Serul imun se administreaza sub forma de injectii intravenoase, intramusculare sau subcutane, în special în scop *terapeutic*.

Dupa cum specia organismului donor este sau nu aceiasi cu a organismului receptor, serurile imune pot fi *omologe* (serurile recoltate de la convalescenti sau de la voluntarii imunizati prin vaccinare) sau *heterologe* (serurile obtinute prin imunizarea animalelor).

Dupa natura antigenelor folosite, se disting trei categorii de seruri imune: a) *seruri imune antimicrobiene*, obtinute prin administrarea antigenelor celulare (de exemplu, serurile antistreptococice si antimeningococice); b) *seruri antitoxice*, obtinute prin imunizarea organismelor cu toxine si anatoxine (de exemplu, serurile antidifteric si antitetanic); c) *seruri imune mixte* (antimicrobiene si antitoxice), obtinute prin imunizarea cu antigene celulare si cu toxine (de exemplu, serul antigangrenos).

Imunitatea pasiva, consecutiva administrarii serurilor imune se instaleaza imediat dupa injectarea intravenoasa sau dupa câteva ore, pe masura resorbtiei anticorpilor, în cazul administrarii pe alte cai. Imunitatea pasiva asigura o protectie de scurta durata (circa 30 de zile), datorita faptului ca anticorpii primiti în mod pasiv au un “timp de înjumatatire” de 14 zile. Persistenta lor este mai îndelungata daca serul este homolog. Dupa catabolizarea anticorpilor exogeni, organismul redevine receptiv la infectie. Datorita acestei particularitati, serurile imune sunt folosite în special pentru tratamentul unei maladii infectioase în evolutie (seroterapie).

Serurile imune (antitoxice, antivirale, antibacteriene) actioneaza prin opsonizarea moleculelor de toxina, a virionilor si a celulelor bacteriene. Efectul este de neutralizare a toxinei si a infectiozitatii virale, iar celulele bacteriene tapetate cu anticorpi devin sensibile la actiunea fagocitelor si a complementului.

Serurile imune pot fi folosite si în scop *profilactic* (seroprofilaxie), la persoane care au fost sigur în pericol de a se infecta si la care se urmareste prevenirea declansarii maladiei în forma clinica. Pentru a evita riscurile de infectie, care pot surveni dupa epuizarea imunitatii pasive, se recomanda ca seroterapiei si seroprofilaxiei sa li se asocieze vaccinarea, pentru pastrarea starii de imunitate dupa catabolizarea anticorpilor exogeni.

Datorita riscului crescut al producerii reactiilor imune secundare (alergie, soc anafilactic), OMS recomanda înlocuirea serurilor hiperimune obtinute pe animale (heterologe), cu cele umane obtinute de

la donori hiperimunizati voluntar sau de la convalescenti (homologe).

În prezent se folosesc seruri imune concentrate si purificate, din care s-au eliminat circa 3/4 din proteinele serului sanguin, pastrându-se numai fractia globulinica specifica. Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat si se evita accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea organismului uman fata de proteinele nespecifice din serul heterolog.

Rezistenta antiinfectioasa înascuta nespecifica

Prin imunitate sau *rezistenta naturala*, înascuta sau congenitala se întelege capacitatea unui organism de a fi rezistent fata de un agent infectios, în absenta unui raspuns imun detectabil. Aceasta proprietate este înascuta pentru organismele unei specii si în mod obisnuit este *absoluta*, adica toti indivizii speciei respective sunt rezistenti fata de un anumit patogen, chiar în cazul inocularii cu doze mari ale agentului infectios. De exemplu, omul este rezistent la agentii patogeni care produc *zoonoze* (agentul pestei bovine, al pestei porcine, al holerei gainilor etc.), iar animalele sunt rezistente la gonoree, rujeola, oreion, dizenterie, gripa etc.

Starea de rezistenta naturala nu este conditionata de contactul anterior cu agentul patogen respectiv, ci este consecinta unei modalitati prompte de reactie a organismului. Starea diametral opusa este aceea de *receptivitate* sau de *sensibilitate* (susceptibilitate), caracteristica organismelor care, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen, reactioneaza prin aparitia unui proces infectios. Starea de nereceptivitate este, uneori, relativa, în sensul ca exista deosebiri individuale de reactivitate în cadrul speciei, unii indivizi fiind total rezistenti, iar altii prezinta diferite grade de receptivitate. Raspunsul diferit al organismelor unei specii, la contactul cu un agent patogen, este rezultatul eficientei variabile a fortelor de aparare a organismului, care, izolate sau în asociatie, opun agentului patogen o bariera de nepatruns, determina inhibarea multiplicarii sau distrugerea lui în tesuturi sau umori, precum si neutralizarea si eliminarea substantelor toxice eliberate. Diferentele sunt, probabil, rezultatul actiunii unor factori genetici. De exemplu, oile din Alger sunt mult mai rezistente la infectia carbunoasa (produsa de *B*. *anthracis*), decât cele din Europa. La primele, macrofagele contin un numar mai mare de lizosomi si enzimele componente au activitate hidrolitica mult mai intensa. S-au evidentiat diferente de sensibilitate a raselor umane la tuberculoza: populatiile

africane sunt mai sensibile. Influentele de ordin genetic asupra rezistentei naturale au condus la concluzii de ordin practic. Pe acest criteriu se face selectia populatiilor (liniilor) genetic pure ale animalelor de laborator, care au o rezistenta foarte mare fata de un agent patogen sau o sensibilitate deosebita.

Ori de câte ori un agent patogen vine în contact cu un organism neimunizat, initierea procesului infectios este stopata, în primul rând prin intrarea în actiune a mecanismelor rezistentei constitutive, nespecifice, reprezentate de *barierele mecanice* (tegumentul si mucoasele), de componentele *moleculare* antiinfectioase a caror sinteza este amplificata în reactia inflamatorie, de componentele *celulare* care au capacitatea de *fagocitoza*. Ulterior, daca barierele rezistentei nespecifice au fost depasite, intra în actiune sistemul imunitar. Mecanismele de aparare antiinfectioasa, specifice si nespecifice, sunt strâns integrate functional, astfel încât, actiunea lor este totdeauna combinata. De exemplu, epiteliul tubului digestiv secreta lizozim, ca factor al rezistentei înascute, iar în stratul de mucus care îl tapeteaza se gaseste IgA, ca factor al imunitatii dobândite.

Barierele mecanice de aparare a organismului sunt reprezentate de *tegument* si de *mucoase*. Epiteliul tegumentar si mucoasele sunt structurile care limiteaza accesul agentilor infectiosi, constituind în primul rând bariere fizice, dar la acest nivel functioneaza mecanisme moleculare si celulare cu rol neutralizant sau litic fata de microorganisme si virusuri. Desi contactul lor cu microbiota normala sau potential patogena este permanent, aceste structuri sunt deosebit de eficiente ca bariere mecanice protectoare fata de infectii. Particularitatile lor functionale sunt conferite de integritatea anatomica, de secretiile proprii, de reînoirea prin descuamare, de impermeabilitatea sau de permeabilitatea lor selectiva. Astfel, tegumentul intact este impermeabil pentru virusuri si microorganisme, dar alterarea structurii sale, în special dupa arsuri, este urmata de infectii.

Suprafata *tegumentului* este acoperita cu o pelicula fina, formata din produsele de secretie ale glandelor sudoripare si sebacee, cu pH acid (pH = 3,0-5,0), care au efect bacteriostatic. Dupa îndepartarea (prin spalare) peliculei de secretie, functia protectoare antiinfectioasa a tegumentului diminua.

Conjunctiva este protejata prin actiunea mecanica si chimica a secretiei lacrimale, în care se gaseste *lizozim.* Lizozimul este o proteina cationica mica, prezenta în toate fluidele organismului, cu efect enzimatic, hidrolizând legaturile glicozidice ale peptidoglicanului parietal bacterian.

Mucoasele sunt acoperite de secretii. Lactoferina este o glicoproteina care leaga Fe^{2+}. La nivelul tractului respirator, rolul

protector fata de agentii infectiosi este îndeplinit de *mucinele* cu efect neutralizant, iar expulzarea lor este asigurata prin miscarea cililor celulelor epiteliale si prin reflexele de stranut si de tuse. Mucinele formeaza un strat mucos vâscos, ce tapeteaza mucoasele digestive si respirator. Ele capteaza microorganismele si antigenele, limitând penetrarea lor în tesuturi.

Histatinele(peptide bogate în histidina) formeaza o familie mica de peptide bazice de 3-5 kD, produse de celulele acinare salivare si pancreatice. Ele inhiba dezvoltarea celulelor de *C. albicans*, în forma infectioasa sau neinfectioasa.

Cistatinele sunt fosfoproteine ce contin cisteina, secretate de celulele acinare. Au efect inhibitor asupra cresterii microorganismelor.

Mucoasa gastrica este protejata de gelul mucos care o tapeteaza, ce formeaza un adevarat glicocalix si de aciditatea conferita de HCl, component al sucului gastric. Bacteriile Gram negative sunt foarte sensibile la actiunea mediului acid gastric. Dupa neutralizarea aciditatii gastrice cu substante alcaline, capacitatea sa protectoare diminua pâna la disparitie si infectiile se instaleaza rapid. Totusi, pe cale digestiva patrund agentii patogeni a numeroase maladii infectioase, evitând bariera aciditatii gastrice. Bolul alimentar este protector fata de aciditate si în interiorul sau exista conditii favorabile supravietuirii agentilor patogeni ingerati odata cu alimentele.

Secretiile mucoase, în compozitia carora intra *mucinele* (glicoproteine), au rol important în apararea antiinfectioasa. Mucinele adera la suprafata agentilor patogeni si a parazitilor, formând un strat molecular care împiedica interactiunea lor cu celulele epiteliale. Lor li se atribuie de asemenea, un rol neutralizant asupra toxinelor. În acelasi timp, secretiile formeaza o pelicula (film) protectoare, continua pe suprafata mucoasei, constituind o bariera greu de trecut pentru microorganisme în calea lor spre situsurile epiteliale de aderenta. Pelicula elimina bacteriile care nu se pot adapta conditiilor de sub pelicula, la granita mucus-epiteliu.

Un alt mecanism nespecific care controleaza cresterea microorganismelor la zona de contact cu mucoasa digestiva, este *peristaltismul* intestinal. Microorganismele adera la mucoasa epiteliala, prin intermediul unor molecule din categoria *lectinelor*, care realizeaza adevarate punti de legatura între suprafata bacteriei si a celulei epiteliale. Peristaltismul intestinal împiedica realizarea acestor interactiuni stabile, creind un flux care deplaseaza microorganismele patogene, înainte ca ele sa colonizeze suprafata epiteliului. Numeroase infectii intestinale accelereaza peristaltismul. Anomaliile miscarilor peristaltice sunt factori favorizanti ai cresterii excesive a populatiilor

bacteriene ale microbiotei normale a tractului intestinal. In absenta unui clearance mecanic normal al tractului digestiv, microbiota normala poate dobândi un rol patologic.

Rolul factorilor humorali în apararea antiinfectioasa nespecifica. Hormonii au un rol esential în reglarea unor mecanisme homeostatice. Ei nu modifica specificitatea de reactie a celulelor limfoide. Concentratiiile optime de hormoni determina o functionalitate optima a sistemului imunitar, iar modificarile lor cantitative induc perturbari ale metabolismului limfocitelor. Pubertatea si sarcina se caracterizeaza prin cresterea steroizilor plasmatici. Cunoasterea multiplelor interactiuni dintre functia imunitara si sistemul endocrin, precum si perfectionarea tehnicii de radioimunodozare (RIA) a hormonilor, au condus la delimitarea unei noi discipline intermediare – *imunoendocrinologia*.

Afectiunile de natura endocrina au un rasunet major în raport cu rezistenta nespecifica fata de agentii patogeni. Un exemplu în acest sens este patologia infectioasa asociata cu diabetul. Bolnavii de diabet fac în mod frecvent infectii de tip tuberculos, infectii urinare si tegumentare de tipul furunculozelor. Ele se datoreaza fie unor dezechilibre locale provocate de lipsa insulinei, fie glicemiei crescute.

Hormonii *tiroidieni* influenteaza rezistenta fata de infectii. Hipotiroidismul mareste incidenta infectiilor.

Cortizolul are influenta directa asupra limfocitelor. Hipofunctia cortexului glandelor suprarenale mareste rezistenta fata de agentii infectiosi.

Capacitatea autosterilizanta a umorilor este un factor decisiv al rezistentei nespecifice. In tesuturi si în umori se gasesc substante cu rol antibacterian: lizozimul, lactoferina etc. Astfel se explica rezistenta organismului fata de numeroasele agresiuni ale microorganismelor, care patrund permanent în tesuturi, pe diferite cai. Microorganismele (în special bacterii) trec din lumenul intestinal în sânge, la toate animalele, inclusiv la om, datorita conditiilor speciale de permeabilitate a epiteliului, create în timpul absorbtiei intestinale. Permeabilitatea mucoasei este mai accentuata la rumegatoare. La om s-a evidentiat ca, postprandial, se produce o *bacteriemie temporara*, originara în cavitatea bucala, ca rezultat al masticatiei sau al periajului dentar. Dupa extractia dentara, exista chiar o perioada septicemica (cu multiplicare bacteriana). Datorita starii de bacteriemie temporara, animalele nu trebuie hranite o perioada de 10-20 de ore înainte de sacrificare.

În mod obisnuit, starile de bacteriemie fiziologica nu sunt urmate de infectii clinice, datorita capacitatii autosterilizante (clearance) a tesuturilor si umorilor, care se manifesta prin mecanisme variate:

– conditiile tisulare improprii multiplicarii microorganismelor si în

primul rând concentratia O_2: microorganismele strict anaerobe nu se multiplica în tesuturile bine oxigenate, ci numai în cele traumatizate sau devitalizate. De exemplu, *C. perfringens*, agentul gangrenei gazoase creste în plagile musculare provocate de explozii, iar *M. tuberculosis* (strict aerob) se localizeaza preferential la nivelul tesutului pulmonar. Dupa distrugerea litica a granulomului, se formeaza un tesut cazeos în care O_2 nu difuzeaza. Se creeaza conditii de anaerobie, improprii multiplicarii celulelor de *M. tuberculosis* si astfel evolutia infectiei este limtata;

- substante din categoria lizinelor
- properdina
- sistemul complement
- interferonii
- proteina C reactiva

Rolul acestor componente humorale în apararea antiinfectioasa si mecanismele actiunii lor vor fi prezentate în acest capitol.

Sisteme celulare cu rol în rezistenta antiinfectioasa nespecifica

Rezistenta antiinfectioasa a organismului uman si animal este rezultatul actiunii unor sisteme celulare cu actiune nespecifica, independenta de caracterul nonself al unei substante sau al unui agent infectios. Functia principala a sistemelor celulare cu actiune nespecifica este *fagocitoza*. Ele intra în actiune dupa ce agentul infectios a depasit barierele mecanice protectoare ale organismului.

Sistemul fagocitar include celule de origine *mezodermica*, cu distributie difuza în organism, care au capacitatea de a îngloba molecule nonself, virusurile si celulele straine si de a le distruge prin procese enzimatice de digestie intracelulara.

Fenomenul fagocitozei (*phagein* = a mânca) a fost descoperit de Ilia Metchnikoff (1882). El a dat denumirea generica de “fagocite”, celulelor libere sau fixe din tesuturi care au capacitatea de a ingera particule straine.

Fagocitoza este cel mai prompt mecanism de aparare si, în filogenie, deriva din functia de nutritie a protozoarelor si metazoarelor inferioare. La organismele superioare, fagocitele îndeplinesc activitati fiziologice importante:

- elimina moleculele organice proprii care au devenit nefunctionale si reintroduc în economia organismului, constituientii lor chimici;

– la vertebratele superioare, fagocitele îndeparteaza celulele îmbatrânite, au rol în remodelarea tisulara în embriogeneza, în remanierea osoasa etc.

I. Metchnikoff a clasificat fagocitele în doua categorii:

– *microfage* (PMN) – celule care fagociteaza particule mici

– *macrofage* – celule care înglobeaza particule mari, chiar celule întregi.

În 1924, Aschoff a creat conceptul de *sistem reticulo-endotelial* (SRE), în care a inclus:

– fagocitele propriu-zise

– celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splina si ganglioni

– celulele endoteliale ale vaselor sanguine si limfatice

– fibroblastele din tesutul conjunctiv.

În 1927, Voltera a propus denumirea de sistem *reticulohistiocitar* (SRH).

În 1970, fagocitele au fost împartite în doua categorii functionale:

– fagocite "profesioniste", capabile sa ingere particule straine tapetate cu Ig sau cu componente ale complementului (C3). Ele au receptori pentru regiunea Fc a Ig si pentru C3. Grupul include *fagocitele mononucleare si polimorfonucleare*;

– fagocite "neprofesioniste", cele care nu au astfel de receptori, functia fagocitara fiind facultativa. Aceasta categorie include *fibroblastele, celulele reticulare* si *celulele epiteliale*.

Celulele înglobeaza materialele nonself particulate si solubile prin urmatoarele mecanisme: *pinocitoza, endocitoza mediata de receptori* (EMR) si *fagocitoza*.

Pinocitoza este procesul prin care o celula înglobeaza fluidele si solutiile si este foarte asemanatoare cu EMR, proces prin care celulele înglobeaza macromoleculele, virusurile si particulele mici. Pinocitoza si EMR au în comun mecanismul bazat pe *clatrina* si se produc independent de polimerizarea actinei.

Fagocitoza semnifica înglobarea particulelor mari(mai mari de 0,5 μm) si se produce printr-un mecanism activ, *dependent de actina*, dar independent de clatrina. Protozoarele fagociteaza pentru obtinerea nutrientilor, iar la *Metazoa*, fagocitoza este functia, în primul rând, a unor celule specializate (macrofagele, neutrofilele) si a evoluat ca un proces care sustine o varietate de procese biologice: înglobarea si distrugerea agentilor infectiosi si a celulelor senescente, remodelarea tisulara în cursul dezvoltarii embrionare, raspunsul imun, procesul inflamator.

Sistemul fagocitar mononuclear (S F M)

Fagocitele mononucleare se gasesc în toate tesuturile, dar în conditii obisnuite, proliferarea lor are loc numai în maduva osoasa.

S F M reuneste toate tipurile de celule cu capacitate fagocitara bine exprimata, precum si precursorii lor. Conceptul S F M a fost elaborat de van Furth (1972), sub egida OMS.

Celulele S F M îsi au originea în celula *stem* din maduva osoasa. Celula stem nu s-a identificat, dar este *nediferentiata,* cu activitate mitotica înalta, este pluripotenta. Ea genereaza nu numai precursorul macrofagului, ci si precursorul eritrocitului, al polimorfonuclearelor si megacariocitului. Pe masura ce se diferentiaza, descendentii celulei stem îsi pierd potentialitatea si devin precursori separati ai liniilor *monocitara, polimorfonucleara, eritrocitara si plachetara .*

Monoblastul este prima celula identificata, pe linia de diferentiere a fagocitelor mononucleare. Are receptori pentru regiunea Fc a Ig, fagociteaza si, *in vitro*, adera de suport. Monoblastul se divide o singura data în doua *promonocite*.

Promonocitul, localizat ca si monoblastul în maduva osoasa, este o celula mai mare (15 μm), citoplasma este acidofila, bogata în poliribosomi. Granulatiile azurofile contin mieloperoxidaza. Cele doua celule rezultate din diviziunea unica a promonocitului sunt *monocite*.

Monocitul ramâne în maduva osoasa timp de 24 de ore de la diferentiere, trece în sânge si devine celula circulanta pentru alte 24-72 de ore. In conditii normale, celulele care circula la contactul cu endoteliul capilar, migreaza spre diferite tesuturi si cavitati, unde devin *macrofage rezidente* sau migreaza spre un focar de inflamatie:

– în plamân, monocitul se diferentiaza direct în *macrofagul alveolar*, fara maturare în tesutul interstitial;

– în sinusoidele ficatului, monocitul devine *celula Kupffer*;

– în cavitatea peritoneala, monocitul vine direct din capilare si devine *macrofag al seroasei*.

În conditii normale, putine macrofage rezidente se divid si ramân viabile 1-3 luni. Nu exista dovada ca ele recircula prin limfa spre vasele sanguine. Probabil ca mor în tesuturi sau migreaza spre ganglionii limfatici. In cazul unei infectii locale sau unui proces inflamator, factorii chimiotactici si alti mediatori ai inflamatiei – citochine si molecule icozanoidice – stimuleaza monocitele sa migreze spre situsul lezat, unde se diferentiaza în macrofagele exudatului.

Dupa migrarea în tesuturile si cavitatile organismului, macrofagele variaza în privinta caracteristicilor morfologice si functionale si au denumiri diferite: celule Kupffer în ficat, macrofage pulmonare si

alveolare în plamân, celule microgliale în SNC.

Distributia celulelor S F M în cele trei compartimente este urmatoarea:

Tipul de celula	*Localizare*
– Celula stem – Monoblastul – Promonocitul – Monocitul	În maduva osoasa
– Monocitul circulant	În sânge
Macrofagul tisular (rezident)	
– Histiocit	În tesutul conjunctiv din tegument În tesutul limfoid secundar(ganglioni, MALT) În maduva osoasa În plamân (macrofage alveolare si tisulare) In membrana sinoviala a cavitatilor articulare În membranele seroase ale cavitatilor peritoneala, pleurala, cardiaca În glande
– Osteoclastul(rezultat prin fuziunea monocitelor)	În tesutul osos
– Microglia (pare a fi de origine monocitara deoarece nu se evidentiaza înainte de formarea vaselor sanguine)	În SN C
Macrofagul intravascular	Celulele Kupffer
– Macrofagul juxtavascular	Histiocitul din pulpa rosie a splinei, din maduva osoasa, din sinusurile ganglionare.
Macrofagul din exudat – Celulele epitelioide – Celulele gigante multinucleate (se formeaza prin fuziunea macrofagelor exudatului).	În focarul inflamator

În SFM nu sunt cuprinse:

- celulele reticulare, de origine a limfocitelor, din maduva osoasa
- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splina si ganglioni
- celulele endoteliale ale vaselor sanguine si limfatice
- fibroblastele
- celulele Langerhans
- celulele interdigitate
- celulele dendritice din ganglionii limfatici.

Originea *celulelor dendritice* nu se cunoaste cu certitudine, dar pare a fi comuna cu a monocitului. Glucocorticoizii induc o scadere rapida a monuclearelor circulante, inclusiv a monocitelor, dar si o disparitie rapida a celulelor dendritice din tesuturi. Acesta este un argument care sprijina ipoteza ca celulele dendritice deriva din precursori din maduva osoasa. Desi ele endociteaza, prelucreaza antigenul si îl prezinta, nu pot fi considerate ca fagocite mononucleare, deoarece nu s-a stabilit cu fermitate originea lor monocitara.

Celulele Langerhans deriva din celule mononucleare circulante care migreaza în tegument. In tegument, celulele Langerhans ramân un interval scurt, înainte de a migra pe cale limfatica, sub forma celulelor cu voal, spre ganglionii limfatici unde devin celule *dendritice* si *interdigitate.*

Fagocitele mononucleare intravasculare si juxtavasculare sunt celule care vin în contact direct cu sângele (celule Kupffer, histiocitele din cordoanele pulpei rosii splenice) sau cu limfa (macrofagele intra- sau extrasinusoidale din ganglionii limfatici). Ele supravegheaza aceste fluide pentru a capta materialele nonself, pe care le prelucreaza si le prezinta limfocitelor. Celulele Kupffer sunt asezate în întregime în lumenul sinusoidelor hepatice si nu au nici o conexiune evidenta cu endoteliul sinusoidal. Datorita pozitiei, macrofagele splenice juxtavasculare, ca si cele din maduva osoasa, trebuie sa strabata endoteliul, înainte de a fagocita materialul nonself.

Macrofagele intra- si juxtavasculare sunt fixe.

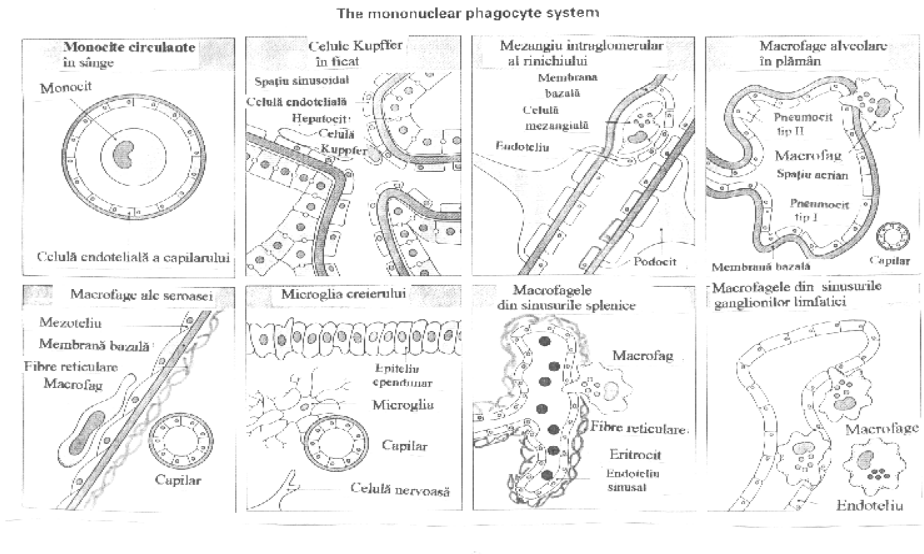


Fig. 97. Celulele *sistemului fagocitar mononuclear*.

Macrofagele tisulare si cele asociate vaselor formeaza o populatie de 17-20 miliarde, într-un organism de 70 de kg. Ele îsi au originea în monocitul sanguin sau rezulta prin proliferarea tisulara a monocitelor imigrate. Se pare ca predomina cele de origine monocitara.

Datorita localizarii lor diverse si a conditiilor fiziologice locale foarte diferite (conditii cvasi-anaerobe pentru cele peritoneale si o buna aerare pentru cele pulmonare), macrofagele sunt heterogene din punct de vedere morfologic, dar au caracteristici structurale si functionale comune:

– sunt bogate în lizosomi (pentru digestia enzimatica a substantelor nonself);

– membrana citoplasmatica formeaza prelungiri fine denumite *voaluri hialoplasmatice*, cu dimensiuni de pâna la jumatate din diametrul macrofagului. In microscopia scanning, suprafata macrofagului se aseamana cu petalele unui trandafir.

Datorita mobilitatii membranei, macrofagul are doua proprietati importante:

– *adera* de suportul solid

– *endociteaza* (pinociteaza si fagociteaza).

Fagocitele sanguine au proprietatea de a migra din patul vascular, în tesuturi, unde devin macrofage rezidente, dar mobile în interiorul tesutului.

Deplasarea tisulara a macrofagului este întâmplatoare (neorientata de stimuli chimiotactici), si se numeste *chimiochineza* sau este orientata si se numeste *chimiotaxie*. Deplasarea orientata este usurata de enzimele pe care macrofagul le secreta, active la pH-ul tisular.

Receptorii membranari ai macrofagului

Sistemul fagocitar mononuclear are capacitatea de a discrimina un numar mare de agenti patogeni, în raport cu selful, utilizând un numar relativ restrâns de receptori, desi agentii infectiosi au tendinta de a suferi mutatii. Aceasta tendinta este contracarata de existenta unor receptori care recunosc componente antigenice bine conservate, care nu se gasesc la eucariotele superioare, dar îndeplinesc roluri esentiale în biologia agentilor patogeni si sunt supuse proceselor mutationale cu o rata scazuta (mananii din peretele levurilor, peptidele formilate ale bacteriilor, LPS, acizii lipoteichoici).

Macrofagul este o celula multifunctionala, care primeste o multitudine de semnale din mediul extracelular, prin intermediul receptorilor membranari, capabili sa recunoasca liganzi ai altor celule sau liganzi moleculari solubili.

Receptori pentru regiunea Fc a tuturor izotipurilor de lant greu al Ig. Cei mai numerosi sunt receptorii pentru regiunea Fc a IgG monomera (IgG citofila), IgG agregata si IgG din complexele imune (Fc γ R I, Fc γ R II, Fc γ R III). Acesti receptori constituie legatura cruciala dintre celulele fagocitare efectoare si limfocitele care secreta imunoglobuline.

Fc γ R I (CD_{64}) este receptorul de mare afinitate, leaga IgG monomera, iar exprimarea sa este stimulata de IFN. Acesti receptori mediaza ADCC.

Fc γ R II (CD_{32}) este receptorul de mica afinitate, leaga slab IgG monomera si are afinitate de 10 ori mai mica decât Fc γ RI, dar leaga usor complexele imune.

Fc γ R III (CD_{16}) au afinitate scazuta pentru IgG monomera si se gaseste pe macrofagele tisulare, neutrofile si celulele NK

Anticorpii citofili se cupleaza la suprafata celulei, prin intermediul receptorilor pentru Fc, iar ulterior leaga antigenul specific. Receptorii pentru Fc al IgE au o densitate semnificativa.

Legarea încrucisata a receptorilor de Fc γ, de catre complexele imune care contin mai mult de o molecula de IgG, stimuleaza activitatea macrofagului. Macrofagele alveolare au un numar mare de receptori

pentru Fc al IgE.

Receptorii pentru complement (CR_1, CR_3, CR_4) leaga fragmentele C3b, C4b, primul fiind foarte eficient ca opsonina, dar mai putin eficient ca mediator al ingestiei.

Receptorii pentru limfochine leaga mediatorii moleculari secretati de limfocitele activate: MIF, MAF, IFN. Sub influenta acestor mediatori, macrofagele devin foarte active în prezenta celulelor nonself.

Receptorii pentru glicoproteinele (lectine) care au glucide terminale resturi de fucozil, manozil, glucozil, acetil-glucozamina, sunt foarte importanti pentru recunoasterea celulelor straine, a hematiilor îmbatrânite, a fungilor, a bacteriilor.

Receptorul de manoza (MR) este o lectina a membranei macrofagelor tisulare, dar lipseste pe monocitul circulant. Acest receptor pare a fi important pentru ingestia agentilor patogeni de catre macrofagele tisulare. Receptorul de manoza recunoaste si leaga cu mare afinitate microorganismele care au pe suprafata lor molecule cu resturi de *manoza si fucoza,* având rol important în fagocitoza levurilor si protozoarelor parazite.

Monocitele sanguine nu exprima MR, ceea ce sugereaza ca acesti receptori sunt esentiali pentru evenimentele inflamatorii.

Receptorii pentru fibronectina sunt implicati în aderenta monocitelor la zonele de discontinuitate ale endoteliului vascular si în ingestia particulelor opsonizate cu fibronectina.

Receptori pentru proteinele care contin Fe, ceea ce explica rolul macrofagului în metabolismul Fe.

Receptori pentru hormoni(de exemplu, receptorul pentru insulina).

Receptorii pentru LPS. Celulele SFM sunt esentiale pentru mecanismul imunitatii antibacteriene înascute.

Macrofagul poseda un mecanism fin de recunoastere a LPS. De multe ori, 1 pg/ml (circa 100 fM) stimuleaza un raspuns detectabil. In solutie apoasa, LPS formeaza complexe macromoleculare, analoge miceliilor fosfolipidice. Aceste complexe se pot insera direct în membrana plasmatica si altereaza fluiditatea ei, iar la concentratii mari, produc dezagregarea membranei celulare. De aceea, s-a considerat ca miceliile LPS se pot insera direct în membrana plasmatica. Dar în conditii fiziologice, LPS difera de varianta purificata, în solutii apoase.

LPS în plasma, în fluidul interstitial sau LPS asociat suprafatei bacteriilor Gram negative, este legat de diferite proteine plasmatice, care usureaza clearance-ul lor. LPS este opsonizat de o proteina (LBP) care leaga LPS (*L*PS *b*inding *p*rotein), iar complexul este recunoscut de receptorul opsonic al suprafetei macrofagului – CD_{14}. CD_{14} se asociaza cu suprafata celulei printr-o legatura glicolipidica. Complexul

ternar format din LPS-LBP-CD_{14} nu transmite semnalul activator, dar activeaza o catena proteica transmembranara.

Caracterizarea complexelor LPS-proteine plasmatice a fost esentiala pentru întelegerea interactiunii LPS-macrofag. Concluzia este ca macrofagul leaga LPS nativ cu o eficienta foarte scazuta, dar leaga foarte eficient complexele LPS-proteine plasmatice, pe calea receptorilor specifici.

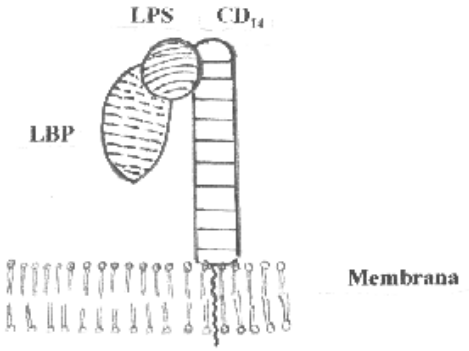


Fig. 98. LPS sunt recunoscute de un receptor (CD_{14}), dupa cuplarea lor cu o proteina plasmatica (LBP = *L*PS *b*inding *p*rotein) si formarea complexului LBP-LPS.

Proteinele plasmatice care leaga LPS sunt anticorpii spe-cifici fata de antigenul somatic (O), complementul, lipoprotei-nele cu densitate înalta (HDL), albumina, proteina care leaga LPS (LBP) si septina. LBP este produsa de hepatocite si are valori normale medii de 7 μg/ml, iar în faza acuta, la om, de 220 μg/ml. Chiar daca este un reactant de faza acuta, LBP se gaseste în concentratii suficiente în plasma normala, pentru a avea rol de aparare în timpul infectiei.

Diferitii receptori fago-citari trimit semnale spre citoscheletul de actina si initiaza mecanismele de internalizare.

Activarea macrofagului

Activarea macrofagului are loc în conditiile stimularii antigenice si este un proces care decurge stadial:

– recrutarea monocitului imatur din sânge si diferentierea în celula capabila sa reactioneze în prezenta limfochinelor;

– dobândirea proprietatii de citotoxicitate sub actiunea unor semnale secundare (cantitati mari de limfochine, LPS etc.).

Limfocitele Th_1 sunt principalele celulele activatoare ale macrofagului, prin intermediul *interferonului* γ. Interactiunea dintre limfocitul T si macrofag sta la baza imunitatii mediate celular si a hipersensibilitatii întârziate. Un alt factor, foarte potent, activator al macrofagului este *lipopolizaharidul* bacteriilor Gram negative (LPS).

Macrofagul activat prezinta urmatoarele particularitati:

– are dimensiuni mai mari, este mai mobil, voalurile membranare sunt mai evidente;

– metabolismul oxidativ al glucozei este mult mai activ;

– continutul enzimatic lizosomal este crescut si creste secretia de proteaze;

– creste rata procesului de endocitoza;

– creste activitatea antibacteriana si antitumorala

– creste sinteza de monochine: IL-1 si TNF.

Activarea este nespecifica, ceea ce explica faptul ca macrofagul activat de componente antigenice ale celulelor de *M. tuberculosis*, este mult mai eficient în activitatea de clearance a oricaror celule nonself, bacteriene, fungice sau tumorale.

Principala monochina mediatoare a actiunii locale sau sistemice a macrofagului activat este TNF α, iar intermediarii reactivi ai O_2 si N_2 au rol major în liza bacteriilor parazite intracelular.

TNF poate avea rol determinant al efectului letal al LPS. Animalele care au primt o doza letala de *E. coli*, supravietuiesc daca li se administreaza AMC ce neutralizeaza TNF. Aceasta denota ca efectul letal al LPS se datoreaza hiperreactivitatii gazdei fata de agentul infectios si infectiei sau efectului toxic direct al LPS.

Daca macrofagul este activat prin stimulare antigenica de durata sau nu reuseste sa elimine agentii patogeni intracelulari, poate deveni refractar la stimularea ulterioara.

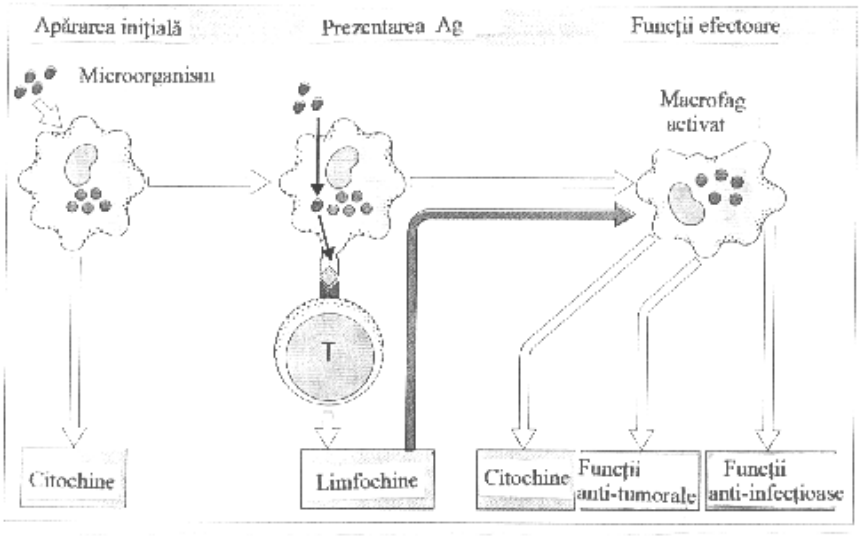


Fig. 99. *Macrofagele* sunt celule esentiale pentru functia de aparare. Ele constituie o linie de aparare, înainte de activarea specifica a limfocitelor T si B. Participa la elaborarea raspunsului, în calitatea lor de celule care prelucreaza si prezinta antigenul. Macrofagele sunt activate de limfochinele eliberate de celulele T si elibereaza limfochine cu functii stimulatoare ale functiei imunitare (dupa Roitt, 1993).

Endocitoza

Endocitoza este activitatea biologica a macrofagului, cea mai bine exprimata. Ingestia macromoleculelor dispersate în faza lichida se numeste *pinocitoza* (*pinos*, grec = a bea). Pinocitoza are loc prin invaginarea membranei, rezultatul fiind formarea unor vezicule mici (0,2 μm) si se numeste *micropinocitoza* sau a veziculelor mai mari (pâna la 1-2 μm) si poarta denumirea de *macropinocitoza.*

Micropinocitoza este *constitutiva* (adica are loc în absenta unui stimul declansator din mediu) si are o rata foarte intensa. In 30 de minute se internalizeaza echivalentul întregii suprafete celulare.

Macropinocitoza are o rata minima în conditii de repaus, *in vitro*, dar este stimulata de serul adaugat în mediu, de complexele imune, de mucopolizaharide etc.

Endocitoza mediata de receptori este un proces specific prin care macromoleculele si antigenele particulate sunt înglobate dupa asocierea lor cu un receptor membranar.

Capacitatea de ingestie a macrofagului se materializeaza în urmatoarele functii:

– functia *citocateretica*, adica de epurare sau de sechestrare a celulelor senescente(de exemplu, hematii). Prin îmbatrânire, hematiile îsi pierd *acidul sialic* din glicopropteinele membranare si expun componente care sunt recunoscute de macrofag. In focarul inflamator, macrofagele curata terenul de celulele moarte si asigura vindecarea leziunilor inflamatorii;

– *functia antixenica* (clearance), adica de îndepartare a materialelor straine, prin fagocitoza;

– *functia imuna*, consta în participarea macrofagului la elaborarea raspunsului imun, prin prelucrarea Ag si cooperarea cu limfocitele.

Fagocitoza. Fagocitoza este procesul de ingestie a materialelor particulate, mai mari de 0,5 μm, printr-un mecanism *dependent de actina* si de obicei, independent de clatrina. Fagocitoza presupune *aderenta* particulei la suprafata macrofagului si *ingestia* ei. La protozoare, functia fagocitara are semnificatia ingestiei nutrientilor, dar la metazoare este un proces complex realizat de celule specializate: macrofage si polimorfonucleare. Functia fagocitara a macrofagului este esentiala pentru înglobarea si degradarea moleculelor nonself, a agentilor infectiosi si a celulelor senescente. Macrofagul este o celula esentiala pentru elaborarea raspunsului imun si pentru raspunsul inflamator. Fagocitoza este foarte importanta în embriogeneza, pentru remodelarea tisulara.

Aderenta semnifica realizarea contactului fizic dintre particula straina si membrana fagocitului si este mediata de moleculele de suprafata ale particulei, de sarcinile sale electrice sau de opsoninele din umori. In functie de mecanismul aderentei particulei straine la suprafata celulei fagocitare se disting doua tipuri de fagocitoza:

– *fagocitoza nemediata de receptori*, conditionata în principal de forte ionice. Astfel sunt ingerate particulele inerte (de latex, de carbune, siliciu, azbest etc.), moleculele agregate de albumina;

– *fagocitoza mediata de receptori* este un proces prin care antigenele particulate sunt înglobate prin intermediul unui receptor membranar si este activa în ingestia bacteriilor.

Receptorii membranari pentru lectine, leaga nespecific componentele glucidice ale celulei nonself. Unele lectine ale suprafetei bacteriene pot sa medieze legarea specifica a bacteriilor de PMN si macrofage, în absenta opsoninelor, rezultatul fiind activarea fagocitului, ingestia si digestia bacteriei. Procesul a fost denumit *lectino-fagocitoza*. Lectino-fagocitoza este definita ca o fagocitoza non-opsonica, bazata pe recunoasterea dintre receptorii suprafetei fagocitului si glucidele suprafetei celulei fagocitate. La nevertebrate, se crede ca lectinele

suprafetei fagocitelor au rol de recunoastere a moleculelor nonself.

Pe suprafata macrofagului se gasesc nu numai receptori de lectine, ci si *lectine cu functie endocitara*, cu rol în clearance-ul glicoproteinelor plasmatice si chiar al eritrocitelor îmbatrânite sau al bacteriilor ajunse în mediul intern. De exemplu, lectina cu specificitate de *manoza* de pe suprafata macrofagului, are rol în apararea antimicrobiana nespecifica. Aceasta lectina leaga celulele infectioase ce expun pe suprafata lor grupari cu manoza, usurând fagocitoza si digestia lor intracelulara.

De cele mai multe ori, interactiunea dintre fagocit si celula straina este mediata de receptori specifici pentru diferite opsonine: Ig, C, fibronectina etc. Cei mai importanti sunt receptorii pentru Fc. Receptorii pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor apartin la doua clase: cei implicati în functiile efectoare si sunt activatori ai functiilor macrofagului si cei care transporta imunoglobulinele prin barierele epiteliale.

Fagocitele recunosc si leaga celulele *opsonizate*. Toate opsoninele mediaza legarea celulei straine de suprafata fagocitului si stimuleaza ingestia sa.

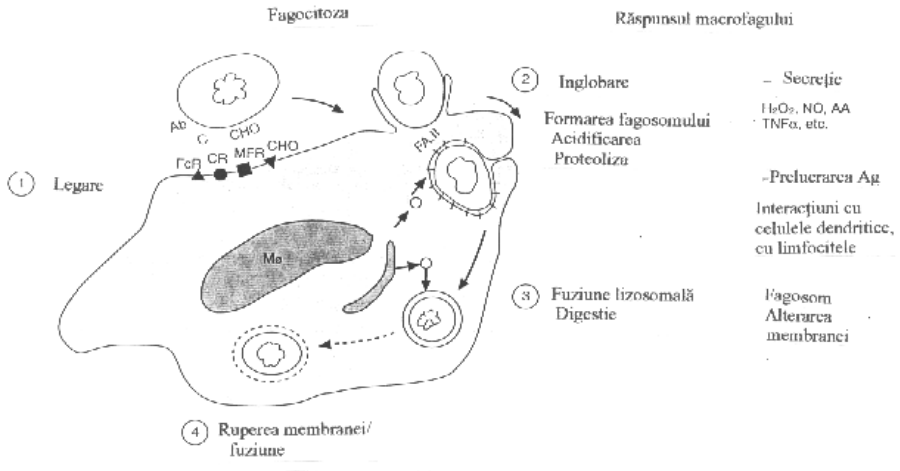


Fig. 100. *Stadiile înglobarii* unui patogen ipotetic de catre macrofage. Receptorii cu rol în recunoasterea fagocitara sunt FcR, CR, MFR (manoza), CHO (glucidic). FA-11 (macrosialina) este o glicoproteina pan-macrofagica, exprimata abundent în fagosomi (dupa Gordon, 1998).

Opsoninele. Denumirea (*opsein,* grec = a aduce de mâncare) semnifica o categorie diversa de molecule care au rolul de a usura ingestia particulelor straine, functionând ca punti de legatura între

fagocit si particula nonself. Opsonina majora termostabila este IgG, iar cea termolabila este reprezentata de proteinele *complementului*. Cele mai importante opsonine sunt anticorpii specifici ai sublaselor IgG_1 si IgG_3, deoarece se leaga cu cea mai mare afinitate de receptorii pentru Fc γ. Legarea anticorpului pe particula nonself este mediata de fragmentul Fab al moleculei IgG, iar regiunea Fc interactioneaza cu receptorii Fc γ ai membranei fagocitului. Fagocitele umane pot exprima 3 clase de receptori Fc γ: FcRI, FcRII si FcRIII. Pentru interactiunea dintre IgG si receptorul sau este esential ca IgG sa fie localizat pe suprafata externa a particulei, pentru ca Fc sa fie accesibil receptorului pentru Fc.

IgM ca atare nu are rol opsonizant, deoarece fagocitele umane nu au receptori pentru Fc al IgM. IgM fixeaza complementul pe calea clasica, cu mare afinitate si particulele tapetate cu IgM pot fi opsonizate cu peptidele derivate din fixarea C. Moleculele de C3b tapeteaza celula bacteriana, formând în jurul ei o patura moleculara. Pentru initierea ingestiei este necesar al II-lea semnal, transmis prin receptorii membranari ai macrofagului.

IgA favorizeaza fagocitoza microorganismelor si eritrocitelor. IgA activeaza calea alterna a complementului si astfel capacitatea sa opsonizanta creste prin legarea proteinelor complementului la suprafata particulei.

IgE nu are proprietati opsonizante.

Componentele opsonizante ale *complementului* sunt C1q, C4b, C3b, iC3b (produsul de degradare al lui C3b). Fragmentele derivate din C3 sunt cele mai importante opsonine, generate prin activarea complementului pe calea clasica sau alterna. Produsul major al clivarii lui C3 (C3b) se leaga covalent pe suprafata particulelor. *M. tuberculosis* leaga fragmentele de C3b si C3bi, care usureaza înglobarea lor în celula fagocitara. Inglobarea pe aceasta cale reduce expunerea celulei bacteriene la compusii toxici ai O_2.

C3b este opsonizant pentru bacteriile Gram negative ce cresc în forme coloniale R, deoarece lipsesc catenele polizaharidice terminale ale LPS. LPS este activator al caii alterne. Formele coloniale S sintetizeaza LPS complete si dupa opsonizare nu sunt fagocitate. C3b este opsonizant pentru celulele eucariote si mediaza interactiunea citotoxica a macrofagului cu celula tinta.

În focarul de inflamatie se sintetizeaza o diversitate de proteine, multe dintre ele având rol opsonizant.

Colectinele formeaza o familie de lectine plasmatice, cu activitate *opsonizanta*. Activeaza complementul si au rol în apararea antiinfectioasa. Domeniul lor lectinic mediaza legarea de structurile glucidice ale suprafetei microorganismelor, iar secventele de tip

colagenic sunt implicate în legarea de receptorul de colectina al suprafetei fagocitelor.

Medicamentele induc modificari ale suprafetei bacteriilor si schimba specificitatile opsonice ale microorganismelor. Antibioticele inhibitoare ale sintezei proteinelor sunt foarte eficiente în acest sens. Proteina M pe suprafata celulelor de *Streptococcus pyogenes* inhiba activarea complementului. Diminuarea cantitativa a proteinei M (dupa tratamentul cu clindamicina si lincomicina) determina o opsonizare crescuta cu C3 si o crestere a activitatii fagocitelor. Acelasi efect, atribuit sintezei scazute de proteina A, s-a constatat fata de celulele de *S. aureus*.

M. leprae poseda capacitatea de a lega *fibronectina,* care apoi are rolul unei punti între bacterie si receptorul de fibronectina al celulei gazda.

Faza de ingestie este conditionata de mobilitatea receptorilor membranari ai fagocitului. Vacuola formata prin invaginarea membranei, se închide asemenea unui fermoar. Daca receptorii membranari nu sunt suficient de mobili, sau daca particula straina nu are un numar suficient de grupari care sa interactioneze cu receptorii fagocitului, ingestia nu are loc.

Ingestia este un proces activ, dependent de energie. Capacitatea unui fagocit de a ingera complexe imune (ingestie mediata de receptorii pentru Fc si C3b) se numeste *imunofagocitoza*.

Dupa ce s-a format, vacuola de fagocitoza este orientata spre aria perinucleara, unde fuzioneaza cu lizosomii si devine *fagolizosom*.

Dupa ingestia unei bacterii sau a unei particule inerte exista urmatoarele posibilitati de evolutie:

- digestia
- persistenta bacteriei în fagocit
- multiplicarea în celula fagocitara
- liza fagocitului si pastrarea viabilitatii celulei bacteriene.

Digestia corespunde situatiei în care celulele bacteriene, inclusiv cele patogene, sunt degradate de enzimele lizosomale, active la pH acid. Simultan sunt digerate si unele proteine membranare ale vacuolei de fagocitoza, iar receptorii membranari sunt recirculati spre suprafata celulei pentru a-si relua ciclul.

Persistenta particulei ingerate are loc în doua situatii:

- unele fiind inerte, nu pot fi digerate (de exemplu, pulberile)
- unele bacterii patogene (*Mycobacterium*) poseda strategii de succes, care le permit sa se multiplice în interiorul celulei fagocitare.

Particulele inerte (azbest, siliciu, carbune) nu sunt atacate de echipamentul enzimatic al macrofagului si sunt pastrate mult timp. Daca

acumularea lor depaseste o limita critica (în special în plamâni) se produc procese inflamatorii locale cu consecinte patologice. La mineri se cunosc afectiuni pulmonare profesionale: antracoza, silicoza, azbestoza (stocarea pulberilor în macrofagele pulmonare). Nefiind degradabile, acumularea excesiva a pulberilor în macrofage produce moartea celulei si eliberarea materialelor depozitate. Ciclul înglobarii este reluat de alte macrofage. Macrofagul activat elibereaza enzime hidrolitice. Rezultatul este reducerea progresiva a suprafetei respiratorii, ca o consecinta a înlocuirii epiteliului alveolar, cu tesut conjunctiv (stare patologica denumita *emfizem*).

Rolul macrofagului în apararea fata de bacteriile cu localizare celulara

Practic, orice celula poate fi infectata, dar fagocitele mononucleare sunt infectate mult mai adesea, deoarece ele fagociteaza bacteriile, au viata lunga si capacitate sterilizanta antibacteriana limitata. Din aceasta cauza, fagocitele mononucleare sunt colonizate de bacterii ca *M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae, L. monocytogenes.*

Pe de alta parte, monocitele fagocitare sunt efectori ai apararii antibacteriene. Pentru a contracara actiunea fagocitelor, bacteriile cu localizare intracelulara au elaborat modalitati strategice care le permit supravietuirea în mediul citoplasmatic ostil. Multiplicarea agentului infectios este esentiala pentru producerea infectiei si a manifestarilor patologice. Multe bacterii patogene, cu localizare intracelulara, nu numai ca se multiplica, dar unele au mecanisme specifice de a scapa din celula gazda si de a se disemina spre celulele vecine, chiar fara sa paraseasca nisa intracelulara.

Bacteriile cu localizare intracelulara au elaborat diferite strategii pentru supravietuire:

- invazia fagocitelor neprofesioniste
- localizarea în compartimente citoplasmatice bine delimitate
- interferenta cu reactivii intermediari ai reducerii O_2
- inhibitia fuziunii fagosom-lizosom
- rezistenta la enzimele lizosomale
- interferenta cu maturarea fagosomilor prin inhibitia acidificarii.

Fagocitele mononucleare reprezinta habitatul major pentru *M. tuberculosis* si *M. bovis*.

La interactiunea dintre fagosom si lizosomi se descriu trei raspunsuri potentiale:

- *fuziunea fagosom-lizosom*, proces în care microorganismele nepatogene si patogene sunt omorâte, iar patogenii cu localizare intracelulara, supravietuiesc si se multiplica în interiorul fagosomului (*L.*

monocytogenes, Leishmania, S. typhimurium);

– *absenta fuziunii* si agentii patogeni se multiplica în fagosomii nefuzionati(*T. gondii, M. tuberculosis*);

– *iesirea agentului patogen din fagosom, în citoplasma* (*T. cruzzi* si posibil *M. leprae*).

Majoritatea patogenilor internalizati sau fagocitati în vezicule de origine membranara, ramân localizati în aceste structuri, dar au elaborat diferite strategii pentru a preveni actiunea mecanismelor celulare litice si le favorizeaza supravietuirea;

– unii agenti patogeni au învelisuri protectoare (capsula polizaharidica si LPS);

– enzimele bacteriene neutralizeaza radicalii O_2, iar enzimele proteolitice secretate, degradeaza proteinele lizosomale ale gazdei;

– unele bacterii patogene sunt dependente de factori ai fagolizosomului, ca semnale declansatoare ale multiplicarii intracelulare. De exemplu, *C. burnetii, S. typhimurium* necesita pH acid pentru a persista în mediul intracelular si pentru a initia replicarea;

– micobacteriile patogene si *L. pneumophila* modifica fagosomul primar ori împiedica acidifierea. Ele pot fi incluse de la început în vacuola celulara, la pH neutru; *M. tuberculosis* ramâne localizat într-o vacuola delimitata de membrana, care rezista fuziunii cu lizosomii si de aceea se acidifica foarte putin. Daca fuziunea are loc, membrana vacuolara nu are ATP-aza care sa pompeze protonii în vacuola (deoarece proteinele membranei sunt înlocuite cu proteine bacteriene) si vezicula ce înconjura celulele de *Mycobacterium* nu se acidifica. Chlamidiile sunt bacterii parazite, obligat-intracelulare, care ramân într-o vacuola neacida, pentru ca evita fuziunea cu lizosomii, în tot ciclul intracelular. Chlamidiile se diferentiaza în doua forme: una ce creste activ în interiorul celulei gazda(corpul reticulat) si forma infectioasa - corpul elementar extracelular - ce nu se divide;

– *S. typhimurium* intra în macrofag prin ondularea membranei si formarea *fagosomilor spatiosi*, în care se dilueaza enzimele lizosomale ale gazdei, ceea ce favorizeaza supravietuirea sa în macrofage. Alteori este posibila inhibitia fuziunii dintre fagosom si lizosomi;

– *L. pneumophila* este înglobata printr-un mecanism special, al fagocitozei “spiralate”. Bacteria ramâne în fagocitul pulmonar, în interiorul veziculei membranare multistratificate si pH-ul nu scade. Acelasi mecanism protejeaza celula bacteriana si în gazda sa naturala, amoeba.

Sursa nutrientilor utilizati de bacterii în interiorul vacuolei nu este cunoscuta. Este posibil ca bacteriile internalizate sa altereze vacuola gazdei într-o masura suficienta, pentru ca nutrientii sa difuzeze din

citoplasma, spre lumenul vacuolei. Alta posibilitate (probabil la *Chlamydia*) este ca proteine de origine bacteriana sa se insere în membrana vacuolei si sa aiba rol de pori, prin care difuzeaza nutrientii.

Câtiva patogeni intracelulari au capacitatea de a *sparge vezicula de fagocitoza* si ramân în citoplasma, unde se multiplica (*L. monocytogenes, Shigella*). Unele specii de *Rickettsia* degradeaza enzimatic vezicula înconjuratoare si deplasarea lor intracelulara este orientata de componentele citoscheletului. Iesirea în citoplasma evita atacul mecanismelor antibacteriene si furnizeaza nutrientii necesari, dar este folosita de putini patogeni. Supravietuirea si multiplicarea lor este rezultatul unei interactiuni echilibrate între celula gazda si bacterie (Brett, 1997).

L. monocytogenes invadeaza celule fagocitare si nefagocitare. Dupa internalizare, vacuolele sunt acidificate si circa 14% dintre celulele de *Listeria* scapa din vacuola fagocitara, prin mecanismul lizei, mediata de *listeriolizina O* (o hemolizina), activata la pH-ul acid al vacuolei. Bacteriile care ramân în vacuola acida, sunt omorâte.

Adeseori, patogeneza acestor infectii nu este consecinta virulentei bacteriilor, ci se datoreaza raspunsului imunitar al gazdei. Rolul limfocitelor T este esential pentru reactivitatea imunitara fata de acesti agenti patogeni si pentru generarea manifestarilor patologice. Reactia tisulara de raspuns la infectia cu aceste bacterii este formarea *granulomului*. Bacteriile nu sunt eliminate complet din granuloame si din acest motiv infectia devine *cronica.*

Toate aceste conditii sunt îndeplinite de *M. tuberculosis, M. bovis*, iar *L. monocytogenes* se deosebeste numai prin aceea ca produce infectii acute.

Salmonella, Shigella au doar o faza intracelulara, la tranzitul din lumenul intestinal prin celulele epiteliale (M) ale placii Peyer, dar raspunsul imun este predominant humoral.

Functiile efectoare ale macrofagului se realizeaza prin urmatoarele mecanisme:

- producerea intermediarilor reactivi ai oxigenului si ai azotului
- limitarea disponibilitatii Fe
- acidifierea fagosomului prin fuziunea fagosom-lizosom
- producerea defensinelor.

Dupa ingestia particulei straine are loc o crestere brusca a intensitatii respiratiei macrofagului. Creste consumul de glucoza si O_2, se activeaza oxidaza membranara dependenta de NADP. NADP-oxidaza reduce O_2 la O_2^- (radicalul superoxid), care este dismutat de SOD, dupa reactia:

O parte din H_2O_2 este descompusa sub actiunea glutation-peroxidazei, reactie în care glutationul este oxidat, iar glutation-reductaza regenereaza glutationul redus.

Fierul este un element esential pentru supravietuirea bacteriilor. Transferina saturata cu Fe este preluata de macrofag pe calea receptorilor specifici. Diminuarea receptorilor macrofagului pentru transferina determina scaderea intracelulara a Fe. Fe este necesar macrofagului pentru activarea mecanismelor care genereaza intermediarii reducerii O_2 si ai azotului, dar este si un nutrient esential al celulei bacteriene. Competitia pentru Fe pare a fi decisiva, în raport cu care fagocitul este un efector al apararii antibacteriene sau este un mediu protector pentru celula bacteriana.

Aceste bacterii nu produc invazine. Ele sunt fagocitate de macrofage cu mare usurinta, deoarece secreta si expun la suprafata cantitati mari de molecule care leaga fibronectina, ceea ce favorizeaza fagocitoza prin intermediul *receptorilor de fibronectina*. *M. tuberculosis* activeaza C si se tapeteaza cu C3, produce enzime care detoxifica intermediarii reducerii O_2, iar NH_4^+ neutralizeaza pH-ul acid al vacuolei de endocitoza.

În concluzie, prin functia fagocitara, macrofagul reprezinta ultima bariera protectoare fata de infectie. Daca aceasta bariera este depasita, infectia se extinde si evolueaza spre septicemie si generalizare.

Alte functii ale macrofagului

Macrofagul este o celula care exercita efecte citotoxice asupra celulelor care poarta pe suprafata lor molecule nonself (celule tumorale). Citotoxicitatea fata de celulele maligne se produce prin câteva mecanisme distincte:

– citotoxicitatea mediata de limfochinele (MAF) secretate de limfocitele stimulate. MAF se leaga atât pe celulele tinta (tumorale) cât si pe macrofag;

– citotoxicitatea naturala, nespecifica, se exprima la un nivel mai scazut. Efectul s-a demonstrat *in vitro*, prin contactul macrofagelor cu celule alogenice si se intensifica dupa stimularea nespecifica a macrofagelor cu diferiti factori chimici sau biologici;

– citotoxicitatea dependenta de anticorpi (ADCC), mediata de moleculele de imunoglobulina fixate pe celula tinta. Regiunea Fc a moleculei de Ig este recunoscuta de macrofag prin intermediul receptorilor specifici. Puntile moleculare între macrofag si celula tinta favorizeaza un contact spatial strâns si transferul factorilor litici.

Functia secretorie a macrofagului este la fel de importanta ca si

cea fagocitara. S-au identificat circa 75 de produsi de secretie, *in vitro*, în mediul de crestere al macrofagelor sanguine si peritoneale, cu o mare diversitate structurala si cu efecte biologice foarte diverse.

Unii produsi de secretie sunt *constitutivi*: lizozimul, componente ale complementului. Alte produse de secretie sunt *inductibile*, adica se sintetizeaza sub actiunea semnalelor primite de la receptorii suprafetei, activati în procesul de endocitoza, sub actiunea endotoxinelor, a limfochinelor, a modificarilor de pH, a hidrolazelor acide, a metabolitilor acidului arachidonic.

Dupa natura si functiile produselor de secretie ale macrofagului, se disting urmatoarele categorii:

– *produsi enzimatici*. Sunt enzime lizosomale active la pH acid, din categoria hidrolazelor: *colagenaza* si *elastaza* hidrolizeaza colagenul si elastina, dar si imunoglobulinele, fibronectina, fibrinogenul. Aceste enzime au rol important în patogeneza bolilor pulmonare distructive (emfizem), deoarece secretia lor creste dupa activarea macrofagelor. Macrofagele secreta *proteina activatoare a plaminogenului la plasmina. Plasmina* lizeaza fibrina din cheagul sanguin care se formeaza la periferia focarului de inflamatie. In focarul inflamator, macrofagul activat secreta *arginaza*. Epuizarea argininei produce inhibitia cresterii tumorale;

– *produsi de secretie cu rol în reactiile de aparare*. Macrofagul sintetizeaza si secreta lizozim (spre deosebire de granulocite care contin lizozim dar nu-l sintetizeaza, iar limfocitele nici nu contin si nici nu-l sintetizeaza). Nivelul seric al lizozimului este o reflectare a activitatii fagocitelor mononucleare. Concentratia serica si urinara a lizozimului creste în starile infectioase. Lizozimul are efect antineoplazic prin actiunea sa directa asupra membranei celulelor tumorale. Macrofagul sintetizeaza si secreta aproape toate componentele caii clasice si alterne a activarii C;

– în procesul infectios viral, macrofagul sintetizeaza interferon;

– *proteine plasmatice*. α 2-macroglobulina inhiba activitatea enzimelor proteolitice si astfel moduleaza efectele litice ale enzimelor lizosomale;

– *proteine ale cascadei de coagulare sanguin* a (tromboplastina);

– *proteine structurale* (fibronectina, intra în alcatuirea membranei bazale);

– *compusi cu efect reglator* asupra altor celule: lipide bioactive (prostaglandine), factori reglatori ai raspunsului imun (IL-1);

– factorul stimulator al angiogenezei, în focarul inflamator;

Functii metabolice ale macrofagului. Macrofagul intervine în metabolismul urmatoarelor categorii de substante:

– *metabolismul Fe*. Hematiile sunt distruse de macrofagele

splenice, în momentul în care rezerva lor de ATP s-a epuizat. Macrofagul preia Fe din hemoglobina si îl cedeaza transferinei, care îl transporta la maduva osoasa. Transferina este sintetizata de macrofag:

– *metabolismul lipidelor*. Macrofagul capteaza lipidele plasmatice si le degradeaza sub actiunea lipazelor proprii;

– sintetizeaza *colesterolul*, unele substante carotenoide;

– sintetizeaza un *factor stimulator* al diviziunii fibroblastelor si al biosintezei de colagen de catre fibroblaste. Activitatile mitotica si de biosinteza ale fibroblastelor sunt foarte importante în procesul reparator tisular (vindecarea leziunii), într-un proces inflamator. Macrofagul participa în mod direct la vindecarea leziunii, prin înglobarea si distrugerea resturilor tisulare moarte, a bacteriilor, a leucocitelor nefunctionale.

Sistemul fagocitar polimorfonuclear

Polimorfonuclearele (PMN) sau granulocitele sunt celule fagocitare “profesioniste” de tip *microfag*, din sângele circulant. Ele se gasesc la toate organismele cu sistem circulator si au rol în eliminarea microorganismelor patogene cu localizare extracelulara. Functia lor se suprapune partial cu a sistemului fagocitar mononuclear. Acesta controleaza microorganismele parazite cu localizare intracelulara, fata de care PMN sunt ineficiente.

Dupa caracterele tinctorilae ale granulatiilor se disting: PMN *neutrofile* (PMNN), *eozinofile* (PMNE) si *bazofile* (PMNB).

PMN sunt adevarate sisteme celulare de “asalt” în procesele de aparare antiinfectioasa. Durata vietii este scurta (câteva zeci de ore), dar numarul lor în sângele circulant este relativ constant, ceea ce denota ca producerea este reglata de necesitatile organismului. La om se distrug 5 miliarde de leucocite si 1o miliarde hematii într-o ora.

Numarul PMN în sânge este un indicator al starii de sanatate. Cresterea numarului de PMN semnifica existenta unui proces infectios în organism, dar este indiciul unei evolutii favorabile, deoarece organismul se apara prin mobilizarea rezervei de PMN medulare, care trec în circulatie.

Scaderea numarului de PMN în cursul unui proces infectios semnifica, de cele mai multe ori, incapacitatea organismului de a se apara.

Numarul absolut al diferitelor categorii de celule în sângele circulant:

Tip de celula	Numar absolut/mm^3	Raportul procentual	Nou nascut
Hematii	5 milioane la barbat		5-8 milioane
	4,5 milioane la femeie		
Leucocite	5000 – 8000	100%	15000 –50000
P M N N nesegmentate	150 – 400	3 – 5%	7000 –30000
PMNN segmentate	3000 – 6000	54 – 62%	
PMNE	50 – 200	1 – 3%	
PMNB	15 – 50	0 – 0,75%	
Limfocite	1500 – 3000	25 – 33%	2000 – 8000
Monocite	285 – 300	3 – 7 %	
Trombocite	200 000 – 400 000		

Numarul total al leucocitelor este de circa 5 x lo^3/mm^3 sânge.

La adult, se remarca o tendinta de scadere a numarului de leucocite circulante: o scadere mai accentuata a numarului de PMNN si o diminuare usoara a numarului de limfocite.

Cresterea numarului de leucocite se numeste *leucocitoza.* Ea se realizeaza prin descarcarea în sângele circulant, a leucocitelor din maduva osoasa. Cel mai adesea, leucocitoza este însotita de polinucleoza (cresterea numarului de PMNN), care pot ajunge la 50 000/mm^3 în cursul infectiei cu agenti piogeni. Numarul leucocitelor creste în cazurile de septicemie, pneumonie, flegmoane, abcese, apendicite (10-15 000 în formele usoare, pâna la 50 000 în formele grave), în reumatism, în cazul tuturor distrugerilor tisulare (în infarctul miocardic). Cresterea este moderata în infectiile dentare, amigdaliene, urinare. Numarul leucocitelor creste în neoplazii. Necroza tesutului tumoral reprezinta un stimul pentru afluxul de leucocite.

Cresterea numarului de PMNN este frecventa în infectiile cu localizare periferica. Cresterea este rezultatul, atât al unei descarcari din depozite, cât si al hiperfunctiei medulare. Hiperfunctia medulara se manifesta prin cresterea numarului de celule tinere (nesegmentate) în sânge. Pentru fiecare neutrofil circulant, în maduva osoasa se gasesc 50 – 100 neutrofile mature.

Arneth a stabilit proportia procentuala a neutrofilelor în functie de numarul segmentelor nucleare. Dupa numarul segmentelor nucleare, PMNN se împart în 5 categorii:

1(nesegm) 2 (2 segm) 3(3 segm) 4(4 segm) 5(5 segm)

5% 35% 41% 17% 2% (distributie

normala)

21%	65%	14%	0%	0%	(apendicita)

Formula deviaza spre stânga, cu predominanta celulelor tinere, ca semn al unei descarcari mai rapide si al hiperfunctiei medulare.

În bolile parazitare (cu protozoare si viermi intestinali), în boli de piele, afectiuni alergice, leucocitoza este însotita de acidofilie. Leucocitoza poate fi rezultatul unor malignitati hematologice (leucemii), cazuri în care predomina elementele tinere ale seriei afectate de transformarea maligna.

Scaderea numarului de leucocite (leucopenie) caracterizeaza infectia gripala, febra tifoida, infectiile grave, în care fortele de aparare ale organismului au fost paralizate. In cazurile extreme de leucopenie (agranulocitoza), numarul PMNN scade pâna la 200/ml, datorita epuizarii potentialului producator al maduvei osoase. Sensibilitatea la infectii este foarte mare.

Diferentierea neutrofilelor

Circa 3/4 din celulele nucleate ale maduvei osoase sunt destinate producerii de leucocite, iar dintre acestea, 2/3 sunt PMNN.

Mieloblastul este primul precursor recunoscut al seriei neutrofilului. Este de doua ori mai mare decât neutrofilul matur.

Promielocitul este de 2,5 ori mai mare decât neutrofilul matur. Este cea mai mare celula din seria de maturare a neutrofilului. Din suprafata concava a cisternelor Golgi se matureaza *granulatiile primare azurofile*. Se numesc *azurofile* deoarece se coloreaza albastru cu colorantul Wright si *primare*, deoarece sunt primele care apar în timpul maturarii neutrofilelor. Odata cu diviziunea promielocitului, producerea granulelor înceteaza si granulele se distribuie în citoplasma celulelor fiice.

Mielocitul rezulta din diviziunea promielocitului. Are aceleasi dimensiuni ca si mieloblastul. In mielocit apar *granulatiile specifice sau secundare*. Cisternele aparatului Golgi îsi schimba polaritatea si pe fata convexa se matureaza aceste granulatii. Se numesc granulatii *specifice*, deoarece se gasesc numai în neutrofile si sunt *secundare* deoarece apar dupa cele primare.

Granulatiile *primare* (azurofile, descrise de Bainton) contin mieloperoxidaza, hidrolaze acide degradative (proteaze, fosfataze, nucleotidaze) si substante cu actiune bactericida (lizozim, lactoferina).

Granulatiile *secundare* (specifice ale lui Bainton) sunt mai mici, mai putin electrono-dense si contin fosfataza alcalina si lizozim. Nu

contin peroxidaza.

Mielocitul se matureaza si rezulta *neutrofilul*, fara diviziune celulara. În neutrofilul matur, adiacente membranei plasmatice se gasesc microfilamente (actina si miozina), ce genereaza fortele contractile necesare locomotiei. Neutrofilul segmentat nu se divide. Cromatina este condensata, iar nucleolul lipseste. Lobulatiile caracteristice ale nucleului nu se coreleaza cu vârsta celulei.

La sfârsitul perioadei de maturare a neutrofilului, scade sarcina negativa de suprafata si creste gradul de deformabilitate a membranei. Dupa maturarea celulara, un mare numar de neutrofile se depoziteaza în maduva osoasa. Aici se gasesc circa 90% din neutrofile. De aici neutrofilul migreaza în lumenul capilar, printre celulele endoteliale.

Granulatiile specifice fuzioneaza foarte repede cu vacuola de fagocitoza, în timp ce aceasta este înca deschisa în spatiul extracelular. Din aceasta cauza, peste 90% din continutul lor se varsa în mediul extracelular. Granulatiile primare fuzioneaza mai târziu cu fagolizosomul. De aceea, circa 1/2 din continutul lor se pierde, iar restul ramâne în fagolizosom.

Sisteme bactericide active în PMNN

Dupa ingestia unui microorganism, în neutrofil se activeaza sistemele moleculare care omoara celula ingerata. In PMNN functioneaza doua sisteme bactericide: unul *independent de* O_2 si altul *dependent de* O_2 .

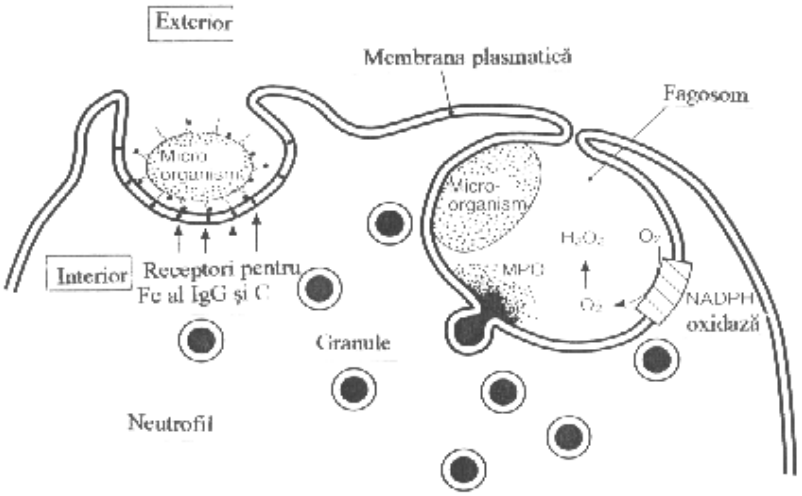


Fig. 101. *Activarea neutrofilului*. Contactul microorganismelor opsonizate cu receptorii de suprafata ai neutrofilului (receptori pentru Fc si C) declanseaza fagocitoza, activarea NADPH-oxidazei si degranularea. In interiorul fagosomului, produsele oxidative pot interactiona cu proteinele din granule, pentru a omorî microorganismele ingerate. MPO = mieloperoxidaza (dupa Roos, 1998).

Sistemul bactericid *independent de* O_2 cuprinde o gama larga de activitati enzimatice: hidrolaze acide, proteaze neutre, lizozim. Lor li se adauga conditii fiziologice incompatibile cu supravietuirea bacteriilor ingerate: mediul acid al vacuolei de fagocitoza, lipsa substantelor nutritive.

Granulatiile neutrofilelor contin proteine bazice (cationice), bogate în lizina, cu activitate bactericida, denumite generic “fagocitine”.

Proteazele neutre se gasesc în granulatiile azurofile si au pH optim al activitatii lor, în jurul valorii 7. Cea mai cunoscuta este *elastaza* si are proprietatea de a cliva proteine foarte diverse: fibrinogen, colagen, elastina. *Catepsina G* face parte din aceiasi categorie. Ambele au activitate bactericida.

Hidrolazele acide, localizate în primul rând în granulatiile azurofile sunt reprezentate de catepsinele B, D, E si realizeaza digestia finala a proteinelor. Efectul lor se produce, în primul rând în mediul extracelular, deoarece în PMNN, digestia celulei bacteriene nu atinge etapele finale.

Lizozimul este o enzima bactericida din granulatiile primare si secundare ale neutrofilelor. Este o muramidaza cationica mica (14,5

kD): ataca mureina din peretele bacterian, prin scindarea legaturilor glicozidice β 1-4 din catenele polizaharidice ale mureinei, dintre resturile de N-acetilglucozamina si acidul N-acetilmuramic si rezulta dizaharide alcatuite din N-acetilglucozamina si acid N-acetilmuramic, la care se pastreaza atasate catenele peptidice. Dupa distrugerea structurii de rezistenta a peretelui celular, celula bacteriana aflata într-un mediu neprotejat osmotic, se lizeaza. Macrofagele secreta cantitati mari de lizozim si îl depoziteaza în granulatiile citoplasmatice, spre deosebire de celelalte tipuri care îl secreta pe masura ce îl sintetizeaza.

Lizozimul se gaseste în granulatiile neutrofilelor, macrofagelor, în celulele epiteliale ale glandelor exocrine (celulele Paneth). Macrofagele secreta constitutiv lizozimul, dar rata sintezei creste în macrofagele activate. Neutrofilele si celulele Paneth depoziteaza lizozimul în granulatiile citoplasmatice.

Efectul litic al lizozimului s-a evidentiat asupra peretelui celular de *Micrococcus lysodeikticus*, la care mureina reprezinta circa 80% din continutul structurii parietale. Actiunea lizozimului este mai putin eficienta asupra peretelui bacteriilor Gram negative si devine posibila dupa tratamentul celulelor cu un amestec generator de radicali activi (acid ascorbic, H_2O_2).

Lizozimul are efect bacteriostatic. Perturba fenomenele de oxido-reducere bacteriana si blocheaza procesele de crestere si diviziune.

Mediul acid din vacuola de fagocitoza are efect bactericid. Valoarea pH scade în câteva ninute, datorita producerii acidului lactic prin metabolizarea anaeroba a glucozei. La pH acid se activeaza hidrolazele acide din granulatii.

Lactoferina este o proteina usor bazica (pI = 8,7) din granulele secundare ale PMNN, sechestreaza Fe^{3+} si astfel inhiba activitatile vitale bacteriene dependente de Fe, având efect bacteriostatic. Lactoferina se gaseste în serul uman, în lacrimi, este abundenta în lapte si în alte secretii. S-au descris trei variante de lactoferina: α, β, γ, primele doua având activitate RN-azica. Celulele intestinale si fagocitele mononucleare au receptori pentru lactoferina, dar n-o sintetizeaza. Lactoferina leaga Fe, facându-l indisponibil metabolismului bacterian. Bacteriile Gram negative, în prezenta lactoferinei, elibereaza LPS si devin sensibile la lizozim, ceea ce denota ca actiunea ei se exercita asupra membranei externe a peretelui celular. Lactoferina are proprietati microbiostatice asupra microorganismelor cu necesitati mari de Fe (coliformi, levuri).

În focarul infectios, lactoferina nesaturata este eliberata din

granulatiile specifice, în mediul extracelular. Ea leaga Fe în conditiile unui pH acid, iar transferina îl leaga la un pH mai mare. Complexul lactoferina-Fe este endocitat de macrofage, pe calea receptorilor pentru lactoferina. Astfel, lactoferina produce hipoferemie localizata la focarul infectios.

Defensinele sunt peptide mici de 3,5 kD (29-34 aminoacizi), bogate în cisteina, moderat cationice(cu 3-10 sarcini pozitive nete), cu actiune antimicrobiana. Sunt asemanatoare unele cu altele, pâna la identitate, cu exceptia aminoacizilor N-terminali. In PMN umane, ele formeaza 30-50% din totalul proteic al granulatiilor primare (azurofile). *In vitro,* au spectru larg de activitate fata de bacteriile Gram pozitive si Gram negative, fungi (*Candida, Cryptococcus neoformans*), celulele maligne si fata de virusurile învelite. Ele actioneaza formând canale în membranele artificiale si probabil în cele naturale.

Oxidul nitric (NO) rezulta prin actiunea nitric-oxid sintazei, dependenta de dezaminarea L-argininei. NO are efecte citotoxice semnificative asupra unui spectru larg de agenti patogeni facultativi si obligat intracelulari: *M. tuberculosis, Plasmodium, Leishmania, C. neoformans, T. gondii, M. leprae, Chlamydia trachomatis* etc.

Sistemul bactericid *dependent de* O_2 este complex si esential pentru functia neutrofilelor si a macrofagelor.

Imediat dupa ingestia unei bacterii, în neutrofil se produce o intensificare brusca a respiratiei, o adevarata explozie a metabolismului oxidativ. O mare parte a O_2 este convertita la intermediarii reactivi ai reducerii sale, care sunt toxici pentru organismul ingerat, dar si pentru tintele extracelulare. Stimularea poate fi fizica (aderenta la substrat) sau chimica, cu agenti solubili (esterii de forbol, formil-metionil-leucil-fenilalanina produsa de bacterii, C5a, Con A, LPS, LTB4, TNF-α) sau particulati.

Sursa reducatoare pentru producerea intermediarilor reducerii O_2, pare a fi o oxidaza complexa cu FAD, legata de membrana PMNN. Oxidaza se reduce preluând electronii de la o piridin-nucleotida redusa (NADPH sau NADH) si se oxideaza prin transferul electronilor la molecula de O_2: $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + + NADP^+ + 2\ H^+$

Prin reducerea partiala a O_2, rezulta intermediarii reactivi. Dupa ce molecula de O_2 accepta un singur electron se formeaza anionul superoxid (O_2^-) (forma ionizata) sau radicalul perhidroxi ($HO_2\cdot$).

O_2^- actioneaza fie ca reducator, fie ca oxidant. Când actioneaza ca reducator al unui substrat, pierde electronul suplimentar si este

convertit la O_2. Când actioneaza ca oxidant al unui substrat, formeaza H_2O_2.

Cei doi radicali ai O_2, $HO_2\cdot$ si O_2^- interactioneaza într-o reactie de dismutatie, în care unul se reduce iar celalalt se oxideaza si rezulta O_2 si H_2O_2, dupa reactia:

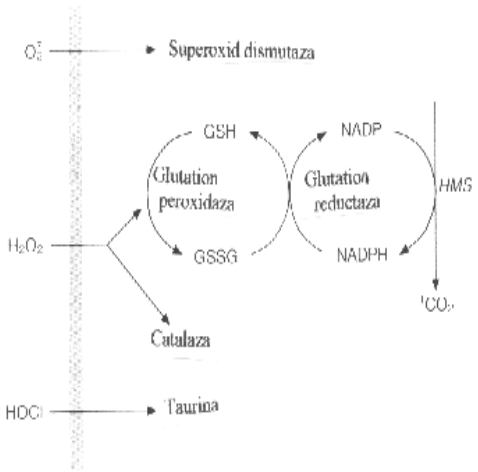


Fig. 102. În fagocite, *inter-mediarii reactivi ai reducerii oxigenului* sunt eliminati de superoxid dismutaza, de glu-tation oxidaza, de catalaza, de taurina. HMS = suntul hexozo-monofosfatului.

$$2\ HO_2\cdot + O_2^- \rightarrow 2\ O_2 + H_2O_2\ .$$

La pH alcalin predomina O_2^-. Dismutatia este catalizata de SOD.

H_2O_2 este redusa de anionul superoxid (O_2^-), dupa reactia:

O_2^- si H_2O_2 sunt bactericide. H_2O_2 este si substrat al mieloperoxidazei (MPO), eliberata din fagolizosom. Efectul bactericid oxidativ este atribuit O_2^-, oxigenului singlet($^1O_2$), H_2O_2, $OH\cdot$ si acidului hipocloros generat de mieloperoxidaza.

$^1O_2$ se formeaza dupa ce molecula de O_2 absoarbe energie. In

molecule, în general, electronii apar în perechi stabilizate cu spini de directie opusa. O_2 este o molecula neobisnuita prin aceea ca spinii electronilor au aceiasi directie. Absorbtia enegiei schimba unul din electroni pe un orbital cu energie mai înalta si concomitent se produce inversia spinului.

H_2O_2 este principalul produs al reducerii O_2 (dependenta de electronii rezultati din oxidarea glucozei), sau prin dismutarea $HO_2\cdot$ si a O_2^- :

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Activitatea antibacteriana a H_2O_2 creste cu multe ordine de marime în combinatie cu mieloperoxidaza si cu un halogen. Peroxidazele se disting prin structura primara, prin grupul prostetic hem si prin halogenul necesar pentru activitatea microbicida. Peroxidaza neutrofilelor si a monocitelor (mieloperoxidaza) se gaseste în granulatiile azurofile (primare) si este descarcata în fagosom printr-un proces de degranulare, consecutiv fagocitozei.

Mieloperoxidaza (neutrofil-peroxidaza = verdoperoxidaza, datorita culorii sale verzi) este o proteina bazica de 150 kD si catalizeaza oxidarea substraturilor donoare de H^+ sau de electroni , de catre H_2O_2.

Mieloperoxidaza, alaturi de H_2O_2 (agent oxidant) si de un halogen (Cl sau I) formeaza un sistem toxic pentru bacterii, fungi protozoare, viermi, dar si pentru eritrocite, leucocite, plachete, celule tumorale.

MPO si H_2O_2 formeaza un complex cu substratul, cu efect oxidant asupra halogenului si rezulta un compus oxidant (acidul hipocloros):

HOCl este oxidantul puternic, foarte toxic pentru microorganisme. HOCl poate reactiona cu diferiti compusi azotati pentru a forma monocloramine si dicloramine.

Fagocitele produc $OH\cdot$ prin reactia O_2^- cu HOCl sau cu NO:

$HOCl + O_2^- \rightarrow OH\cdot + OH^- + Cl^-$

$NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$ (anion peroxinitrit)

$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$ (acid peroxinitros)

$ONOOH \rightarrow OH\cdot + NO_2$

Sistemul MPO poate fi eliberat la exteriorul celulei si sa devina toxic pentru microorganismele adiacente (bacterii, fungi, protozoare),

pentru virusuri, pentru helminti, pentru celulele normale si maligne.

Peroxidaza eozinofilelor poate utiliza Cl, dar este mai putin eficienta decât MPO.

Complexul *MPO – H_2O_2 – Iod* formeaza un sistem de iodurare a bacteriei ingerate.

Ionul (OH^-) si radicalul hidroxil ($OH\cdot$) au efecte citotoxice puternice. Ei se formeaza prin interactia H_2O_2, cu sarurile de Fe:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$$

Când concentratia Fe este limitanta, este necesara reducerea Fe^{3+} pentru formarea $OH\cdot$

Fe^{3+} se reduce prin reactia $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$.

Oxigenul singlet revine la starea obisnuita cu emisiune de lumina (chemiluminiscenta).

$^1O_2$ pare sa se formeze în sistemul MPO-H_2O_2-halogen. Acest sistem emite lumina, ceea ce sugereaza formarea $^1O_2$ în fagocite.

Leucocitul PMN este supradotat cu o gama larga de mijloace bactericide. PMN combina mai multi factori antibacterieni, în sisteme complexe cu o putere bactericida superioara fiecaruia izolat. Cel mai eficace sistem bactericid este MPO – H_2O_2 – halogen. Diferitele sisteme bactericide nu au o distributie egala la toate speciile de mamifere. La om, MPO are activitate maxima. Actiunea predominanta a unuia sau altuia dintre sistemele bactericide depinde si de natura celulei fagocitate.

Deficiente functionale ale sistemului PMNN

Sistemul PMNN este esential pentru apararea organismului fata de microorganismele infectioase. Deficientele sale numerice sau functionale se rasfrâng asupra rezistentei antiinfectioase a organismului.

Cele mai cunoscute anomalii ale sistemului PMNN sunt *neutropeniile*, de diferite grade. Când numarul PMNN scade sub 1000 celule/mm^3, riscul infectiilor creste mult, iar în cazul unei scaderi accentuate (200 PMNN/mm^3) nu mai exista posibilitatea unui raspuns protector eficient. Neutropenia se datoreaza fie unei productii medulare sub nivelul normal, fie unei distrugeri periferice extensive a neutrofilelor.

Deficientele functionale ale neutrofilelor sunt foarte numeroase si diverse: deficiente de aderenta, de chimiotaxie, de fagocitoza, de

activitate bactericida.

Deficientele de aderenta se datoreaza absentei unor glicoproteine membranare (de 110 si 180 kD), ceea ce împiedica migrarea lor extravasculara. Pacientii sufera infectii bacteriene si fungice recurente.

Maladia cronica granulomatoasa este datorata mutatiei unei gene lincata pe cromosomul X, fiind cea mai cunoscuta deficienta a activitatii bactericide a neutrofilelor. Capacitatea de ingestie este normala, dar omorârea bacteriilor care nu elibereaza H_2O_2 (*S. aureus, Seratia marcescens*) este foarte mult diminuata, datorita unei defect al *oxidazei respiratorii*, care nu determina explozia oxidativa a fagocitului dupa fagocitoza.

Efectul bactericid se mentine fata de bacteriile care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). Fagocitele acestor pacienti au un metabolism oxidativ deficitar. Ingestia nu este urmata de intensificarea metabolismului oxidativ si din aceasta cauza nu se genereaza intermediarii reactivi ai reducerii O_2. Creste incidenta infectiilor cu bacterii aerobe catalazo-pozitive, care inactiveaza H_2O_2 rezultata din propria lor activitate metabolica. Infectiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentosi (*Aspergillus*) sunt trenante si însotite de reactii inflamatorii ample, care evolueaza în granuloame, ca o reflectare a incapacitatii de a inactiva chemoatractantii si de a degrada antigenul. Deficienta enzimatica esentiala este oxidaza care transfera electronii de la NADPH la O_2, pentru a forma anionul O_2^-.

Maladia congenitala Chediak-Higashi se caracterizeaza printr-o activitate fagocitara mult diminuata a macrofagelor si a PMN, deoarece lizosomii lor nu fuzioneaza cu fagosomii. Din aceasta cauza, bolnavii sufera infectii repetate cu microorganisme oportuniste.

Aceste maladii pun în evidenta importanta mecanismelor de fagocitoza pentru apararea organismului, fata de infectiile cu microorganisme oportuniste.

În concluzie, fagocitoza contribuie decisiv la rezistenta organismului uman si animal fata de agentii infectiosi. Aproape 80% din materialele nonself (bacterii, molecule) sunt epurate la primul pasaj al sângelui prin ficat, plamâni si splina. Dupa ce trece de câteva ori prin aceste organe, sângele se sterilizeaza.

Actiunea opsoninelor este foarte importanta pentru stimularea fagocitozei. IgM este cea mai eficienta opsonina fata de bacteriile Gram negative, iar IgG are o eficienta opsonizanta de 500 – 1000 de ori mai mica. Cresterea ratei fagocitozei complexelor imune si a particulelor tapetate cu componente ale C (C3b) este consecinta prezentei

receptorilor pentru Fc si pentru C3b, pe membrana fagocitelor “profesioniste”, ceea ce le permite intensificarea specifica a activitatii de endocitoza. Ele se deosebesc de fagocitele “amatoare”(celulele reticulare), lipsite de astfel de receptori.

Sistemul complement

Sistemul complement este un set de proteine si glicoproteine plasmatice, care reprezinta circa 10% din globulinele serului normal uman si al vertebratelor, cu rol esential în apararea organismului. Majoritatea componentelor sale sunt proteine cu actiune enzimatica (proteaze). Ele nu sunt imunoglobuline si concentratia lor plasmatica nu se modifica dupa imunizare.

Proteinele complementului C se gasesc în plasma tuturor vertebratelor. Ele actioneaza nespecific si completeaza efectele imunitare specifice ale anticorpilor.

Actiunea sistemului C a fost evidentiata în 1884 de Grohman, iar ulterior, de Nuttall si Buchner. Ei au demonstrat ca serul are efecte litice asupra unor bacterii *in vitro*, efecte care nu se mai produc dupa încalzirea serului la 56^{o} timp de 3o de minute. Factorul care mediaza liza bacteriana este termolabil si Buchner l-a denumit *alexina* (*allexein* = a distruge). In 1890, Behring si Nissen au realizat un experiment, devenit clasic: serul proaspat de la cobaiul imunizat a lizat celulele de *Vibrio metchnikovi*, dar serul de la cobaiul neimunizat nu a avut aceasta proprietate. Asadar, factorul litic din ser (alexina) actioneaza în strânsa cooperare cu anticorpii.

Pfeiffer (1894) studia reactiile imunitare la cobai, dupa infectia cu *Vibrio cholerae*, în diferite variante experimentale. La cobaii imunizati cu celule omorâte de *V. cholerae*, dupa inocularea vibrionilor virulenti în cavitatea peritoneala, a remarcat disparitia lor rapida, iar la cei neimunizati, inocularea este urmata de infectia mortala. Fenomenul lizei vibrionilor a fost reprodus *in vitro*, prin punerea în contact a serului imun de cobai, cu celulele de *V. cholerae*. Incalzirea la 56^{0} (30 de minute) a serului imun de cobai anuleaza efectul sau litic *in vitro*, dar este restabilit prin adaugarea serului proaspat neimun. Activitatea litica a serului imun este rezultatul actiunii cooperante a anticorpilor si a unui factor termolabil nespecific.

Se cunosc 11 proteine ale caii clasice, 3 proteine suplimentare ale caii alterne si 6 proteine cu efect reglator (inhibitorii). Componentele caii clasice sunt numerotate cu cifre arabe, în ordinea descoperirii lor, de la

1 la 9 si se activeaza în secventa 1, 4, 2, 3, 5 – 9. Majoritatea lor sunt beta-globuline (beta-1, beta-2).

Proteinele complementului sunt alcatuite din 1-2 catene peptidice, reunite prin punti S-S, cu exceptia lui C4, care are 3 catene, iar C1q are o structura particulara unica.

Unele componente ale caii alterne sunt notate cu litere mari: B, P, D.

Fragmentele peptidice derivate din proteoliza sunt notate cu sufixele *a, b* etc. (de exemplu, C3a, C3b). Fragmentele *b* sunt mai mari si se combina direct cu o tinta membranara, iar fragmentele *a* sunt mai mici, se elibereaza în solutie si stimuleaza raspunsul inflamator. Starea activata a factorilor C se marcheaza cu o bara: de exemplu C1.

Mecanismul general de activare a sistemului complement

Proteinele componente ale C se activeaza în doua cascade enzimatice legate între ele, denumite *calea clasica* si *calea alterna.* Cele doua cai se intersecteaza într-un punct, *clivajul lui C3*, evenimentul cheie al activarii sistemului C.

Fiecare componenta activata este o proteaza înalt specializata, care la rândul ei cliveaza un fragment peptidic al unui precursor plasmatic. Consecutiv clivarii, rezulta un fragment principal, care expune un situs de legare la membrana. Fragmentul se leaga pe membrana si la rândul sau devine enzima activa urmatoare a secventei de reactie.

Cascada de fixare a C se amplifica în fiecare etapa, deoarece fiecare enzima poate activa numeroase molecule ale reactiei urmatoare a secventei. Ca mecanism general de actiune, activarea C este analoga cascadei de coagulare si de fibrinoliza. Principala diferenta consta în faptul ca sistemul C este legat de membrane sau de complexe imune si în conditii fiziologice actioneaza local.

În calea clasica, complexul proteic C1 se leaga de complexele Ag-Ac si devine o proteaza activa, ce cliveaza si activeaza C4 si C2. Se formeaza o enzima complexa - *C3-convertaza*, care scindeaza specific C3.

Calea alternativa nu necesita prezenta anticorpilor pentru activarea complementului. Unele componente chimice, în special cele din peretele bacterian si fungic, învelisul unor paraziti, peplosul viral, activeaza un alt set de proteine serice, care la rândul lor cliveaza C3.

Efectele finale ale activarii sunt comune pentru ambele cai.

Calea clasica de activare a complementului

Mecanismul molecular al activarii C pe calea clasica s-a studiat pe complexul *eritrocit-anticorpi*

Calea clasica de activare a sistemului C este initiata de complexele Ag-Ac, care contin o molecula de IgM sau cel putin doua molecule de IgG (subclasele IgG_1 si IgG_3), fixate pe epitopi foarte apropiati. IgA si IgE nu fixeaza complementul. Pentru ca moleculele de IgG sa fie apropiate, determinantii antigenici trebuie sa aiba o anumita densitate. Daca epitopii sunt prea îndepartati, complementul nu va fi activat, indiferent de numarul moleculelor de IgG din complexul Ag-Ac.

Secventa evenimentelor fixarii complementului cuprinde urmatoarele etape: a) *recunoasterea*; b) *activarea enzimatica*; c) *atacul membranar*.

Unitatea de *recunoastere* a sistemului C este complexul C1. C1 este un complex alcatuit din 3 proteine: C1q, C1r si C1s, asociate lax, necovalent, într-un complex cu Ca^{2+}.

C1q este o proteina de 400 kD, formata din 18 catene polipeptidice, reunite în 3 subunitati de câte 6 lanturi fiecare. Fiecare din cele 3 subunitati ale C1q este formata din doua helice triple, în forma de Y, reunite la un capat printr-o structura în forma de tija, iar la capatul opus se termina printr-o conformatie globulara, nehelicala. Primii 80 de aminoacizi care formeaza helicea fiecarui triplu helix contin numeroase secvente de tipul Gly-Pro-Ileu-hidroxilizina, foarte asemanatoare cu a fibrilelor de colagen. La nivelul extremitatii globulare se gasesc situsurile de legare cu mlecula de Ig.

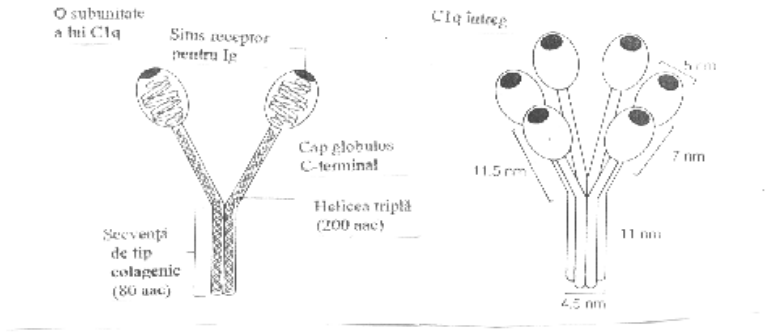


Fig. 103. *Structura lui C1q*. Cele 18 catene peptidice sunt reunite în 3 subunitati de câte

6 catene fiecare. Fiecare subunitate este formata de 2 helice triple, legate în forma literei Y la o extremitate, iar la cealalta se termina printr-un cap globular. Receptorii pentru fixarea complexului imunoglobulinic sunt situati la extremitatile globuloase.

Molecula de Ig expune situsul de legare pentru C1q, numai daca este legata de complexele Ag-Ac. C1q interactioneaza prin domeniul sau globular cu domeniul C2 al IgG si respectiv cu domeniul C3 al IgM din complexele imune. Regiunea Fc a IgG sau IgM sufera modificari conformationale si evidentiaza secventa de aminoacizi, la care se leaga C1q. Resturile de aminoacizi ale IgG care leaga C1q sunt Glu 318, Lys 320 si Lys 322. Cantitatea de C1q fixata, creste proportional cu patratul numarului de molecule de IgG si este proportionala cu concentratia de IgM.

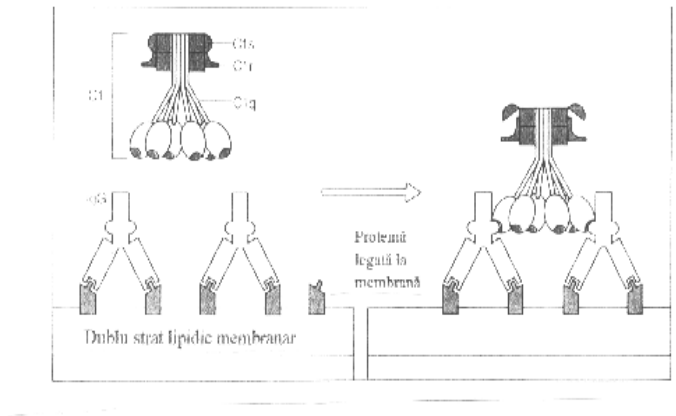


Fig. 104. *Fixarea lui C1qrs*. O pereche de molecule de IgG este fixata de un antigen proteic repetitiv, din membrana celulei. C1 se fixeaza la regiunea CH_2 a IgG. Activarea lui C1r si C1s are loc prin clivarea interna (reprezentata aici de modificarea orientarii lor fata de C1q).

C1q nu are activitate proteazica.

În prezenta Ca^{2+}, C1q se asociaza cu 2 catene C1r si 2 catene C1s. Mecanismul de activare a lui C1r si C1s nu este cunoscut. Ele sunt foarte asemanatoare (83 kD fiecare) si prin clivarea activatoare a lui C1r, rezulta 2 fragmente: unul usor de 27 kD si altul greu de 56 kD.

Fragmentul usor C1r are activitate serin-proteazica si pare sa actioneze asupra lui C1s, pe care-l cliveaza în doua fragmente inegale.

Fragmentul mic rezultat din clivarea C1s interactioneaza cu urmatoarele doua proteine – C4 si C2 – pe care le cliveaza si le activeaza.

Activarea lui C1 se face dupa reactia globala:

$$EA + C1 + Ca^{2+} \rightarrow EAC1 \ (EAC1qrs)$$

Sistemul de activare enzimatica

C1s are activitate esterazica si activeaza componenta C4.

C4 este alcatuit din 3 catene polipeptidice, legate prin punti S-S, notate cu α, β, γ.

C1s activat cliveaza un fragment amino-terminal (77 aminoacizi), de 9 kD, denumit C4a, din lantul α. Restul moleculei, C4b, releva o punte tioester interna pe lantul α si formeaza o legatura covalenta cu gruparile $-NH_2$ sau –OH ale multor proteine.

Clivarea lui C4 are loc în plasma. Mai putin de 10% din moleculele C4 se leaga la suportul activator, fie la complexul C1qrs, fie pe membrana într-un situs adiacent.

Reactia globala a activarii lui C4:

$$EAC1 + C4 \rightarrow EAC14b + C4a$$

În prezenta ionilor de Mg^{2+}, C4b din complexul EAC14b leaga C2, pe care C1s îl cliveaza în doua fragmente: cel mare, C2b, de 70 kD ramâne legat pe C4b si formeaza complexul *C4b2b*, denumit *convertaza lui C3*.

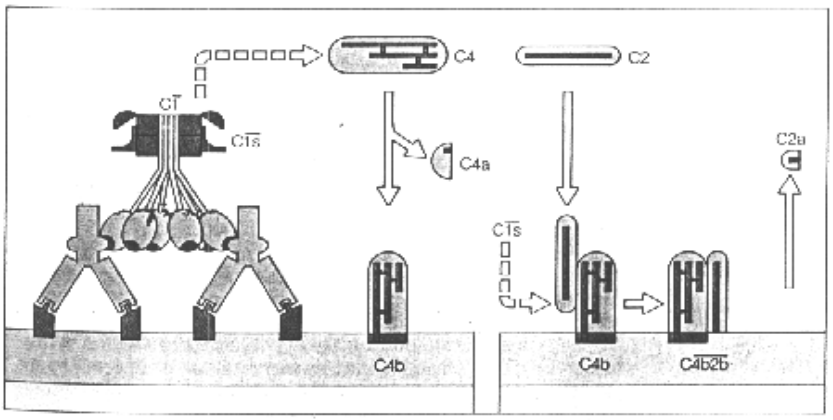


Fig. 105. *Formarea lui C4b2b* (convertaza lui C3 în calea clasica). C1s cliveaza C4 si elibereaza fragmentul C4a. Fragmentul C4b se fixeaza pe membrana adiacenta, prin intermediul puntii tioesterice care se expune. C2 seric se leaga de C4b în prezenta

Mg^{2+} si este clivat de C1s, eliberând C2a si formând C4b2b (convertaza lui C3 pe calea clasica).

C2b din complexul EAC14b2b este relativ instabil (timpul de înjumatatire, 10 min., la 37^{o}) si se disociaza ca fragment inactiv, dar restul complexului – EAC14b – leaga si cliveaza o alta molecula de C2 si reface complexul EAC14b2b. Reactia globala a activarii lui C2 este:

$$EAC14b + C2 \rightarrow EAC14b2b + C2a$$

Clivarea lui C3 în calea clasica. Clivarea lui C3 este evenimentul central al fixarii C, pe calea clasica sau alterna.

C4b2b (convertaza lui C3), dintr-un situs membranar adiacent sau din complexul C1qrs4b2b detaseaza un peptid de 77 aminoacizi (C3a), de la capatul N-terminal al lui C3 si releva un situs de legatura tioesterica pe fragmentul mare C3b.

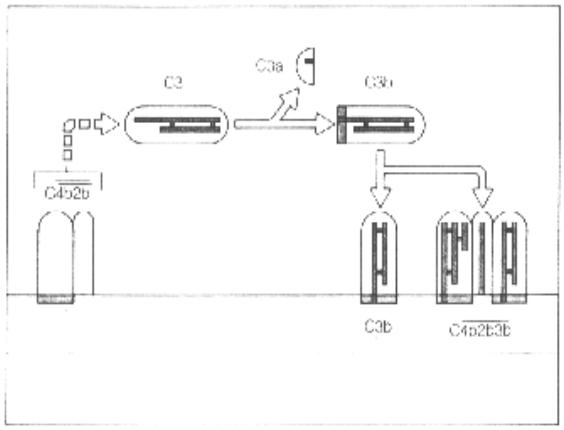


Fig. 106. *Actiunea convertazei C4b2b asupra lui C3*. Complexul C4b2b cliveaza anafilatoxina C3a de la extremitatea N-terminala a peptidului α al lui C3. Anafilatoxinele au activitate chimiotactica pentru PMN, dar C3a are o activitate chimiotactica slaba. C3 clivat expune o punte tioesterica interna si determina legarea moleculelor de C3b, în apropiere de C4b2b. Unele mole-cule de C3b se leaga chiar la complexul C4b2b si formeaza C4b2b3b, care este convertaza lui C5 în calea clasica.

Peptidul de 9 kD este *anafilatoxina C3a*, iar C3b este principala *opsonina* a serului.

Fiecare unitate C1qrs4b2b cliveaza sute de molecule C3, deoarece C3 are o concentratie plasmatica ridicata. Majoritatea moleculelor de C3b ramân în plasma si au rol opsonizant. Receptorii pentru C3b se gasesc pe toate celulele fagocitare(neutrofile, macrofage, eozinofile), dar si pe eritrocite, pe celulele epiteliului glomerulului renal.

Moleculele opsonizate de C3b, prin situsul tioesteric se leaga de gruparile $-NH_2$ sau –OH ale proteinelor din membrana celulara.

O parte a moleculelor C3b se leaga la complexul C4b3b de la situsul membranar si formeaza urmatoarea unitate catalitica, C4b2b3b – *convertaza lui C5*.

C3b cliveaza C5 si rezulta un peptid de 9 kD, adica C5a, din lantul α al lui C5, iar restul este C5b.

C5b se fixeaza pe membrana suport activatoare si initiaza formarea *complexului de atac membranar.* C5b liber este instabil si se agrega. Stabilitatea este conferita de complexarea cu C6.

Reactiile urmatoare ale caii au ca rezultat formarea complexelor moleculare progresiv mai mari, *fara ruperea legaturilor peptidice*.

Complexul C5b6 este *hidrofil*.

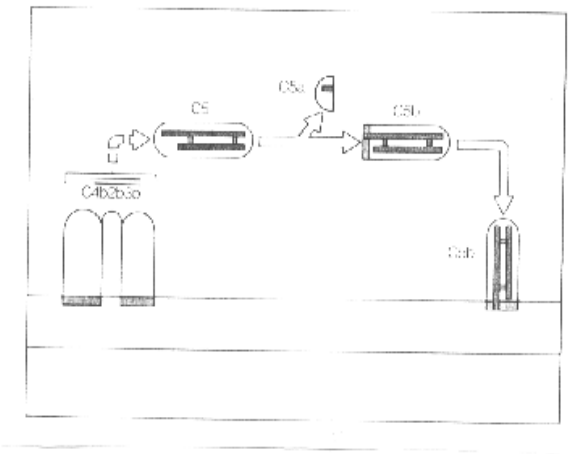


Fig. 107. Fixarea lui C5. C4b2b3b detaseaza frag-mentul C5a (un peptid de 15 kD), din catena α a lui C5. Se formeaza fragmentul principal, C5b, care expune un situs de legare la membrana. Fixarea lui C5 initiaza activarea celorlalte componente ale cascadei, care duc la formarea com-plexului de atac membranar.

În prezenta lui C7 se formeaza complexul C5b67, cu proprietati *amfifile*: este hidrofob pentru ca expune grupari nepolare si nu formeaza legaturi de H cu moleculele de apa, dar se leaga cu fosfolipidele, însa are si grupari hidrofile. Existenta simultana a gruparilor hidrofobe si hidrofile în acelasi complex poate explica tendinta sa de polimerizare. In

solutie, C5b67 este instabil(timpul de înjumatatire este 0,1 secunde), dar se stabilizeaza prin insertia în dublul strat lipidic membranar si are proprietati detergente.

La complexul C5b67 se polimerizeaza C8 si C9 si rezulta un complex macromolecular – C5b6789, de forma cilindrica, vizibila la microscopul electronic prin tehnica criofracturarii, în membrana hematiilor. Complexul are o suprafata externa hidrofoba, un ax central hidrofil si reprezinta *complexul de atac membranar* (CAM). Moleculele de C9 sunt esentiale pentru distrugerea celulei. Circa 18 molecule de C9 se leaga la un situs si prin polimerizare formeaza *canale transmembranare.* Aceste canale penetreaza stratul lipidic al membranei, pe directie perpendiculara si permit intrarea rapida a cationilor (Ca^{2+}, Na^{+}) si a apei. Hematiile se umfla si se sparg, iar celulele nucleate devin permeabile, pierzând initial moleculele mici (K^{+}) si apoi pe cele mari (nucleotide, proteine). Colorantii ionici, care sunt exclusi de celulele intacte, patrund în citoplasma (colorarea cu tripan blue sau eozina se foloseste pentru a detecta celulele nucleate lezate prin fixarea complementului).

Formarea canalului transmembranar prin polimerizarea lui C9 are loc numai la nivelul situsului membranar. Complexul C5b6789 este instabil în solutie, ceea ce expica restrângerea efectului litic numai la situsul la care s-au initiat evenimentele.

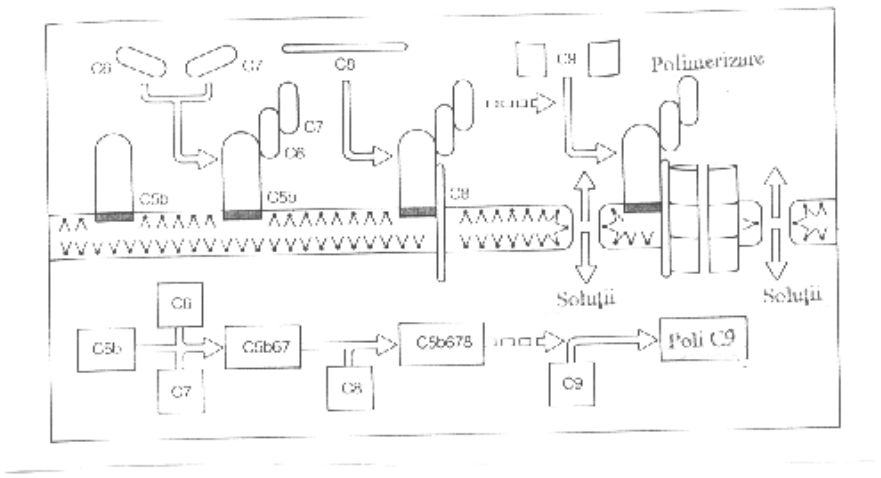


Fig. 108. *Formarea complexului de atac membranar C5-9*. Dupa legarea lui C5b la

membrana, C6 si C7 se leaga pentru a forma complexul stabil C5b67, care reactioneaza cu C8, formând complexul C5b678, cu capacitatea de a disloca membrana. Complexul induce polimerizarea lui C9, ce formeaza structurile tubulare care traverseaza membrana. Dislocarea componentelor membranei permite schimbul liber al ionilor si al apei, rezultatul fiind *liza*.

Ansamblul CAM format din C5b-C9 a fost cunoscut ca având functie litica asupra bacteriilor. Asamblarea CAM pe membrana leucocitara nu produce efect citotoxic. Dupa insertia CAM în membrana leucocitara, celula se activeaza deoarece CAM actioneaza ca ionofor, producând cresterea concentratiei Ca. Se genereaza radicalii toxici ai oxigenului si se activeaza metabolismul acidului arachidonic pe calea ciclooxigenazei si respectiv a lipooxigenazei. Leucocitul elimina o mica vezicula membranara care contine complexul CAM.

Amplificarea caii clasice. Capacitatea de amplificare a caii clasice este foarte mare. O molecula de IgM legata de un epitop, leaga la rândul ei, o molecula de C1. C1s activat cliveaza circa 100 molecule de C4, din care numai circa 20 molecule C4b se leaga de complexul Ag-Ac. Numai 5% din fragmentele C2b sunt legate pentru a forma C4b2b. Acest complex cliveaza mii de molecule C3.

Calea alterna a fixarii complementului

Calea alterna sau *properdinica* a complementului se activeaza în absenta complexelor imune. Fixarea complementului este activata de cristalele de urati (la persoanele cu guta), de suprafata unor bacterii, de polizaharidul pneumococic, de proteina C reactiva, detectabila în sânge în faza acuta a maladiilor infectioase.

Calea alterna de fixare a complementului este prima linie de aparare humorala fata de infectii, înainte de intrarea în actiune a sistemului imunitar.

Existenta caii alterne a fost sugerata de Pillemer (1954), care studia mecanismele humorale de aparare la organismele neimunizate. Prin incubarea polizaharidului particulat din peretele levurilor, denumit *zimosan*, cu serul normal, Pillemer a observat ca la 37^0 are loc activarea complementului si epuizarea sa din ser. La temperaturi mai mici, complementul nu se activeaza, dar serul îsi modifica proprietatile, fiindca dupa separarea particulelor de zimosan prin centrifugare, complementul nu se mai activeaza. Concluzia a fost ca zimosanul interactioneaza cu un factor din ser, chiar la o temperatura inferioara activarii complementului, care se poate elua de pe particule si restabileste capacitatea serului de a activa complementul. Factorul a

fost denumit *properdina* (pro = perdere).

Properdina a fost considerata mult timp ca un tip special de anticorpi naturali ai serului normal, cu un titru mic. Este o globulina de 150 kD, alcatuita din trei subunitati identice, asemanatoare structural cu imuno-globulinele si are mobilitate γ. Are actiune litica asupra bacteriilor, ce se exercita în cooperare cu proteinele sistemului complement si în prezenta ionilor de Mg^{2+}. Se pare ca properdina reprezinta un complex de anticorpi naturali ce se formeaza în cursul vietii ca rezultat al stimularilor cu antigene ale microbiotei intestinale normale.

Clivarea lui C3 în calea alterna. Secventa alternativa a activarii complementului este dependenta de fragmentul C3b si de trei proteine serice care nu participa la secventa clasica: *properdina (P), factorul B si factorul D*. Este necesara prezenta ionilor de Mg^{2+}.

Calea alterna este initiata de diferite polizaharide, mai ales de origine microbiana (zimosan, inulina, LPS al bacteriilor Gram negative, acizii teichoici ai bacteriilor Gram pozitive), de suprafata unor paraziti, de molecule agregate de anticorpi (chiar ale izotipurilor care nu fixeaza complementul, IgG_4, IgA). Calea alterna pare a fi fiziologic activa la un nivel scazut. Amplificarea ei este stopata de un grup de proteine reglatoare din plasma si de pe suprafata celulelor tisulare, dar inexistente pe suprafata microorganismelor (bacterii, fungi). Polizaharidele lor constituie situsuri de legare pentru C3b si blocheaza efectele inhibitorii ale proteinelor reglatoare (unele microorganisme au dobândit factori de virulenta, care se comporta ca proteine reglatoare ale complementului, pentru ca leaga si inactiveaza C3b si inhiba fixarea complementului).

C3 nativ, cu cea mai mare concentratie plasmatica dintre componentele complementului (600-1800 mg/l) este instabil si se reînoieste. O forma modificata a lui C3, denumita C3i este echivalentul functional al lui C3b, pentru ca are o legatura tioester care se leaga covalent cu gruparea $–NH_2$ sau –OH.

Factorul B se leaga de C3b, fixat pe o suprafata activatoare, formând un complex C3bB. Cele mai multe molecule de C3b ramân în faza lichida si sunt inactivate de factorul H, dupa formarea complexului C3bH. Unele suprafete activatoare favorizeaza legarea factorului B pe C3b dupa excluderea factorului H. Complexul C3bB este clivat de factorul D (o proteaza activa din ser). Se formeaza un fragment mic (Ba)de 30 kD si complexul C3bBb, *convertaza lui C3*, analogul functional al lui C4b2b al caii clasice.

C3bBb se disociaza usor si îsi pierde activitatea, dar prin legarea

proteinei serice P se formeaza complexul PC3bBb, relativ stabil, cu proprietati proteolitice, care cliveaza C3 la aceiasi legatura peptidica, ca si în calea clasica si elibereaza aceleasi fragmente, C3a si C3b.

Este de mentionat ca C3b este atât componenta a complexului enzimatic, cât si produs al actiunii sale.

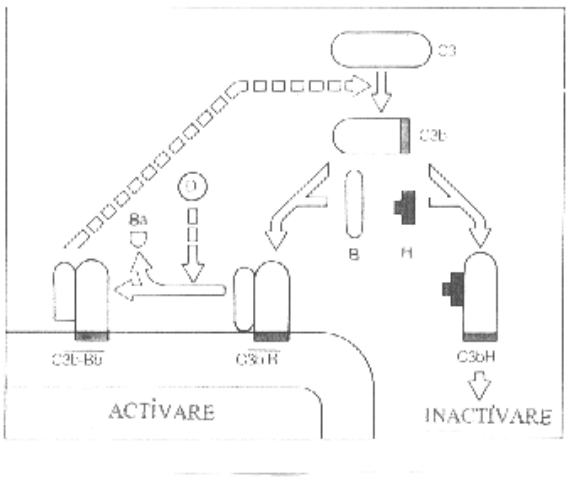


Fig. 109. *Calea alterna*. C3b si factorul B se aso-ciaza si formeaza C3bB, care este convertit în con-vertaza activa a lui C3 – C3bBb, prin clivarea frag-mentului Ba, sub actiunea factorului D. C3bBb am-plifica conversia lui C3 în C3b, care se combina din nou cu factorul B si perpetueaza bucla retro-activa pozitiva. C3b leaga factorul B pe o suprafata activatoare. In faza lichida sau pe o suprafata neac-tivatoare, C3b leaga pre-ferential factorul H, împie-dicând formarea lui C3bB.

Treptele ulterioare ale activarii complementului sunt aceleasi, descrise în calea clasica.

Enzimele de clivare a lui C3 (C4b2b în calea clasica sau PC3bBb în calea alterna) se combina cu una sau mai multe molecule de C3b si formeaza convertazele lui C5.

Functiile complementului

Componentele sistemului C realizeaza 3 categorii de functii esentiale:

– *citoliza* (liza celulelor eucariote si bacteriene) si liza virusurilor învelite;

– *opsonizarea*, proces care implica tapetarea celulelor straine cu molecule derivate din activarea proteinelor complementului si usuraea ingestiei lor de catre celulele fagocitare;

– *activarea celulara* reuneste efectele generate de peptide derivate

din activarea complementului, care se leaga specific de receptorii unor celule si determina degranularea mastocitelor, migrarea unor celule mobile în focarul inflamator, intensificarea sau inhibitia raspunsului imun.

Efectul litic al activarii sistemului complement s-a studiat asupra hematiilor de berbec, tapetate cu anticorpi specifici. Pe suprafata hematiilor de berbec se gasesc antigene de tip Forssman, de natura lipopolizaharidica, foarte raspândite în natura (bacterii, plante animale). Ele lipsesc în tesuturile de iepure si de aceea, imunizarea iepurelui cu hematii de berbec stimuleaza sinteza anticorpilor specifici la titru înalt.

Sursa de sistem complementar este serul de cobai.

Hematiile se sensibilizeaza cu anticorpi, în doza subaglutinanta. Proportia hematiilor lizate creste odata cu cantitatea de complement adaugata în reactie.

Gradul de liza a hematiilor se masoara prin determinarea spectrofotometrica a intensitatii culorii supernatantului, datorita eliberarii hemoglobinei.

Unitatea hemolitica a complementului este definita de cantitatea de complement care lizeaza 50% din hematiile sensibilizate, în conditii standardizate (densitatea hematiilor, concentratia Ac, forta ionica a Mg^{2+} si Ca^{2+}, pH, temperatura).

În cazuri patologice (de exemplu, hemoglobinuria paroxistica nocturna), activarea complementului se produce si *in vivo*. Hematiile se comporta ca suprafata activatoare, initiind fixarea complementului pe calea alterna si liza prin activarea componentelor terminale ale complementului.

IgG anti-Rh, *in vitro*, în prezenta complementului nu lizeaza hematiile, probabil datorita distantei prea mari între determinantii antigenici ai suprafetei eritrocitului.

Bacteriile Gram negative, opsonizate cu anticorpi, pot fi lizate de complement, prin aceiasi secventa de reactii ca si hematiile. Bacteriile Gram pozitive si micobateriile sunt rezistente, probabil datorita structurii peretelui celular, deoarece protoplastii lor sunt lizati de complement.

In vivo, activarea complementului, în excesul cantitativ al complexelor imune circulante, produce lezarea celulelor sau favorizeaza procesele inflamatorii.

Efectul opsonizant al activarii complementului este rezultatul generarii unui numar mare de molecule de C3b, neimplicate în complexele C4b2b3b sau PC3bBb, care formeaza o patura moleculara opsonizanta pe suprafata celulei tinta, usurând aderenta ei de receptorii pentru C3b ai fagocitelor. Formarea unei pelicule de molecule de C3b pe suprafata celulei tinta, este probabil una din cele mai importante

functii biologice efectoare ale cascadei de activare a C. Receptorii pentru C3b se gasesc si pe suprafata unor celule nefagocitare: limfocitele B, o subpopulatie a limfocitelor T, dar o importanta deosebita o au receptorii de pe suprafata hematiilor (la primate) si a plachetelor (la mamiferele neprimate). Receptorii eritrocitari pentru C3b au un rol esential în transportul complexelor Ag-Ac-C, la ficat si splina. Legarea complexelor imune pe suprafata hematiilor este esentiala pentru eliminarea lor. Diminuarea activitatii receptorilor eritrocitari pentru C3b are ca efect persistenta complexelor imune în circulatie, depozitarea lor în rinichi si plamâni, însotita de manifestari patologice. Mecanismul de epurare (clearance), mediat de receptorul pentru C3b, probabil a evoluat ca o modalitate de a elimina cantitatile mari de complexe Ag-Ac, ce se formeaza în unele infectii cronice(cu virusul hepatitei B, C, cu agentul malariei, cu HIV etc.).

Activarea celulara este determinata de fragmente cu activitate biologica, rezultate din clivarea unor componente ale C, denumite *anafilatoxine* si consta în stimularea functiilor specifice ale unor tipuri celulare.

Anafilatoxinele C3a si *C5a* sunt peptide eliberate de la extremitatea N-terminala a lui C3 si respectiv C5, prin clivarea catalizata de convertazele specifice. Efectele acestor peptide de 77 aminoacizi sunt multiple, dar în esenta au functie de anafilatoxine. Termenul de “anafilatoxina” a fost atribuit, deoarece cobaii sufera socul fatal, asemanator *anafilaxiei* (stare fiziopatologica opusa celei de protectie), dupa injectarea unui ser homolog normal, care a fost incubat cu diferite componente activatoare ale complementului (de exemplu, inulina, complexe Ag-Ac, talc). Efectul anafilactic s-a atribuit anafilatoxinelor care deriva, în special, din clivarea lui C3 si C5, dar si a lui C4.

Anafilatoxinele C3a si C5a sunt generate *in vivo*, în reactiile inflamatorii ce au loc în imediata vecinatate a complexelor imune care fixeaza complementul. Rezultatul este cresterea concentratiei locale de proteine serice si a densitatii leucocitelor activate.

C3a, C4a si C5a sunt foarte asemanatoare ca structura: C3a si C4a au 77 aminoacizi, iar C5a are 74 aminoacizi. La capatul – COOH toate au Arg. C3a produce urmatoarele efecte:

– *contractia musculaturii netede în unele organe*

– *eliberarea histaminei din mastocite* (histamina este vasoconstrictoare în faza initiala si prin constrictia celulelor endoteliale mareste permeabilitatea capilara cu producere de edem; în faza a II-a histamina produce vasodilatatie periferica si scaderea brutala a tensiunii arteriale).

C3a este rapid inactivata în umorile organismului, sub actiunea carboxipeptidazei B, care cliveaza Arg terminala. Se cunoaste secventa aminoacizilor si activitatea ei biologica pare sa rezide în octapeptidul C-terminal. Injectarea C3a în tegumentul uman initiaza un raspuns prompt, care imita reactia de hipersensibilitate imediata (indurare si eritem), iar efectul este blocat de medicamente antihistaminice.

C5a este de 10-20 de ori mai activa decât C3a si are activitati biologice mai extinse, dar eficacitatea sa *in vivo* este mai redusa deoarece cantitatea de C5a formata în cascada de activare este mult mai mica decât cantitatea de C3b. C5a produce urmatoarele efecte:

- este factorul major al chimiotactismului pentru neutrofile
- determina fenomenul marginatiei lor în vase si neutropenie circulatorie
- activeaza neutrofilele, declansând cresterea metabolismului oxidativ al glucozei si producerea H_2O_2 cu efect bactericid;
- stimuleaza sinteza leucotrienelor de catre neutrofile (LTB4), care prelungesc faza de permeabilitate crescuta indusa de C5a;
- stimuleaza degranularea mastocitelor;
- stimuleaza contractia musculaturii netede.

Proprietatile sale persista în restul peptidic, dupa scindarea Arg.

Proteine reglatoare ale activitatii sistemului C

Amplificarea excesiva a activitatii C este controlata de un set de 7 proteine reglatoare: 5 proteine ce inactiveaza complexele C în solutie si doua proteine de membrana ce inactiveaza complexele C pe celulele normale. Aceste proteine actioneaza în principal, prin inhibarea formarii, prin accelerarea degradarii sau prin inactivarea lui C3b si a convertazelor lui C3 si C5. Activitatea enzimatica a lui C1r si C1s este reglata de un inhibitor al esterazei C1 (C1-INH). C1-INH inhiba activarea în faza fluida a lui C1, când acesta nu este asociat cu complexe Ag-Ac, rezultatul fiind disocierea rapida a lui C1r si C1s. C1-INH formeaza un complex ireversibil cu C1r si C1s, blocând activitatile lor enzimatice si le disociaza de C1q. Deficienta C1-INH este asociata cu angioedem. C2b si C4b stimuleaza contractia muschilor netezi si determina cresterea permeabilitatii vasculare, producând edem. C2b stimuleaza secretia membranelor mucoase si de aceea în forma ereditara a bolii (angioedem ereditar), episoadele implica tractul respirator (care pericliteaza viata) si durere intensa gastrointestinala. C1-INH este sintetizat în ficat si poate fi masurat cantitativ prin imunodifuzie radiala sau prin nefelometrie. 15% din pacientii cu angioedem ereditar au nivel normal al lui C1-INH, dar este inactiv.

Proteina care leaga C4b (C4bp) actioneaza ca un cofactor al proteazei serice (factorul I), care degradeaza C4b.

Factorul I este o serin-proteaza care cliveaza si inactiveaza C4b si C3b (în C3c si C3d). C3c este eliminat, iar C3d se asociaza cu C3b si îi inhiba activitatea enzimatica.

Factorul H este elementul cheie care controleaza functionarea caii alterne. El regleaza asocierea dintre C3b si factorul B. Formarea complexului C3bH blocheaza legarea factorului B. Factorul H disociaza complexul C3bBb. Factorul H se cupleaza cu C3b în oricare din localizarile sale, dar în special cu C3b liber în faza fluida.

Factorii H si I (inactivatorul lui C3b) controleaza enzimele ce cliveaza C3 si C5. Factorul I inactiveaza C3b si C4b, iar factorul H accelereaza degradarea C3-convertazei din calea alterna, prin disocierea Bb de complexul enzimatic. Factorii H si I au rol în clivarea C3b, la forma inactiva C3bi, clivat ulterior în C3c si C3d. C3b în faza fluida este inactivat de factorii H si I.

La pacientii cu deficiente ale factorilor H sau I, nivelul lui C3 este foarte scazut, datorita formarii necontrolate a C3-convertazei, ceea ce determina catabolismul rapid al lui C3 si a factorului B. Ei sufera infectii bacteriene recurente, datorita slabei opsonizari si chimiotaxii.

Proteina inactivatoare S se combina cu complexele C5b67 în solutie si blocheaza insertia lor în membrana celulara. Se formeaza complexul C5b67S, care poate sa interactioneze cu C8 si C9, dar nu mai are efect litic.

Proteine reglatoare asociate membranei celulare. Pe suprafata majoritatii celulelor sanguine (cu exceptia celulelor NK, a monocitelor medulare) si a altor categorii de celule se gaseste *factorul accelerator al disocierii* (DAF) celor doua convertaze ale lui C3. DAF solubil se gaseste în plasma si urina. Sub actiunea sa are loc disocierea complexelor C4b2b si C3bBb (rezultând C4b, C2b, C3b, Bb). Acest factor nu este o proteina integrata a membranei, ci este numai ancorata în membrana, prin atasarea cu capatul C-terminal la inozitol-fosfatidil.

Cofactorul proteic membranar este o proteina integrata, care se gaseste pe aceleasi categorii de celule ca si DAF. Functioneaza ca un cofactor proteolitic pentru disocierea proteolitica a lui C4b si C3b.

Functionarea cascadei de activare este controlata chiar de unele dintre propriile sale componente. De exemplu, C3bBb este o convertaza relativ instabila, cu timpul de înjumatatire de 5 minute. Disocierea factorului Bb produce inactivarea convertazei, cu efect sever de limitare a amplificarii caii alterne asupra lui C3.

Properdina este un factor stabilizator al convertazelor lui C3 si C5, prelungind activitatea lor.

Epuizarea experimentala a complementului seric

Diminuarea experimentala a nivelului complementului plasmatic se realizeaza prin injectarea complexelor Ag-Ac formate *in vitro*. Injectia este însotita de administrarea antihistaminicelor, pentru a preveni socul anafilactic, consecutiv producerii anafilatoxinelor si eliberarii masive a histaminei.

Cea mai selectiva si ampla depletie a lui C3 este produsa de veninul de cobra (*Naja naja*). Componenta activa a veninului de cobra (o proteina de 140 kD) este omologa, din punct de vedere functional cu C3b, dar este diferita structural de acesta si este rezistenta la activitatile inhibitorii care se exercita în mod normal asupra lui C3b. Deoarece functioneaza ca C3b, factorul din veninul de cobra (CoF) interactioneaza cu factorul B si activeaza calea alterna. Se formeaza un complex stabil, *PCoFBb*, cu functie de convertaza a lui C3. C3b eliberat, formeaza o cantitate mare de PC3bBb, alimentând bucla de amplificare a convertazei C3. Astfel, C3 este eliminat eficient pentru 4-96 de ore.

Un efect similar de stabilizare a caii alterne de activare a complementului îl are *factorul nefritic* (NF). Factorul nefritic este un auto-anticorp IgG_3, mai mare decât IgG datorita glicozilarii, cu specificitate fata de C3-convertaza caii alterne (C3bBb). Factorul nefritic stabilizeaza complexul enzimatic C3bBb, împiedicând inactivarea de catre proteinele H si I. În prezenta NF, activarea C3 progreseaza necontrolat. Consecinta este o hipocomplementemie profunda a lui C3, dar C4 ramâne normal. Pacientii cu NF prezinta infectii bacteriene recurente si au lipodistrofie partiala, o perturbare a metabolismului lipidic.

Biosinteza componentelor sistemului complement

Aproape toate componentele complementului sunt sintetizate în cea mai mare parte (peste 90%) în ficat, de catre *hepatocite*: C3, C6, C8, factorul B. Fac exceptie componentele C1, locul sintezei fiind *epiteliul gastrointestinal* si *urogenital*. *In vivo*, monocitele sanguine si macrofagele tisulare sintetizeaza C1, C2, C3, C4, C5, factorii D si B, properdina, factorii H si I, numai pentru propriile lor necesitati, fara sa influenteze concentratia complementului seric. Sinteza acestor componente se intensifica în macrofagele activate în procesele inflamatorii, furniz@nd un mediu favorizant al procesului inflamator.

Nivelul lui C1q este proportional cu nivelul IgG, adica C1q scade în

hipogamaglobulinemie si creste în hipergamaglobulinemie. Alte câteva componente ale complementului (C3, B) sunt reactanti de faza acuta, adica cresc cantitativ ca raspuns la procesul inflamator.

Deficientele de biosinteza a componentelor sistemului C sunt asociate cu stari patologice, rezultata dintr-o capacitate diminuata de eliminare a complexelor imune.

Deficienta sintezei C1q, r, s sau a C4 este însotita de manifestari patologice autoimune caracteristice lupusului eritematos diseminat. Absenta totala a lui C3 este asociata cu infectii severe, în special septicemice, cu pneumococi si meningococi, ceea ce denota importanta lui C3 si a componentelor care îl activeaza, în apararea antiinfectioasa a organismului. Deficientele lui C5, C6, C7 sau C8 nu se asociaza cu o sensibilitate crescuta la infectii.

Rolul complementului în apararea antiinfectioasa

Functia esentiala a C este aceea de *opsonizare* a celulelor nonself si a virusurilor infectioase, prin componenta C3b, dar are si functii litice în cooperare cu IgM si IgG, specifici fata de diferite componente ale agentilor infectiosi (bacterii, fungi, virusuri).

Pentru ca efectul sa fie bacteriolitic, trebuie sa se produca lezarea ireversibila a membranei externe a bacteriilor Gram negative sau a stratului mureinic al bacteriilor Gram pozitive.

Anticorpii fata de structurile bacteriene care se extind la o distanta relativ mare de suprafata celulei (fimbrii, flageli) nu au efect litic, deoarece C este activat la o distanta prea mare de membrana externa a bacteriilor Gram negative.

Unele bacterii Gram negative si toate bacteriile Gram pozitive pot sa-si pastreze viabilitatea, chiar în conditiile activarii C. Atributul rezistentei lor la factorii serici este un factor de virulenta al suprafetei bacteriene, care se comporta ca proteina reglatoare a activitatii C: inactiveaza C3b.

Structurile bacteriene care determina rezistenta la factorii litici ai serului sunt, în primul rând, moleculele complete de LPS (cele care prezinta catenele polizaharidice laterale). Acestea sunt variantele virulente ce formeaza colonii *S*. Mutantele care cresc sub forma coloniilor *R*, sintetizeaza molecule LPS incomplete(lipseste polizaharidul terminal al moleculei) si sunt sensibile la factorii serici.

Mutantele coloniale *S* activeaza C la nivelul moleculelor de LPS cu catene laterale lungi, dar la o distanta prea mare de membrana externa si liza nu se produce.

La bacteriile Gram pozitive, principalul component activator al caii alterne a C, este peptidoglicanul.

Materialul capsular polizaharidic al bacteriilor patogene Gram pozitive si Gram negative, în general este un substrat ineficient al fixarii C, datorita continutului sau ridicat de acid sialic. Incapacitatea activarii caii alterne, de catre polizaharidele capsulare este cel mai important mecanism prin care bacteriile evita opsonizarea si atacul fagocitelor.

Acidul sialic al suprafetei eritrocitare are functii reglatoare fata de proteinele C, deoarece mareste afinitatea de legare a factorului H, fata de C3b legat de eritrocite.

Activarea C este initiata si de alte molecule serice cu rol de opsonine.

Proteina C reactiva se leaga cu mare afinitate de fosforil-colina, un component major al acizilor teichoici din peretele celular al bacteriilor Gram pozitive. Legarea proteinei C reactive de suprafetele celulare bogate în fosforil-colina initiaza calea alterna a fixarii C.

Fibronectina serica are rol de opsonina foarte eficienta. Ea se gaseste în plasma, dar si pe suprafata celulelor. Se fixeaza pe suprafata cocilor Gram pozitivi si leaga C1q, initiind calea clasica a fixarii C.

Proteina care leaga manoza (PBM) din serul mamiferelor si din ficat are rol în clearance-ul microorganismelor din sânge. Este o lectina cu rol opsonizant, care se leaga de oligozaharidele fungilor. Stimuleaza fagocitoza si activeaza C pe calea alterna, producând liza agentului patogen.

Sistemul complement a evoluat ca un sistem proteic de opsonizare a complexelor imune, ceea ce confera unor celule circulante si fixe, capacitatea de a lega aceste complexe.

Procesul inflamator

Inflamatia este o reactie de aparare locala, nespecifica. Etimologic, denumirea vine de la latinescul “inflamare” = a arde.

Sub aspect functional, *inflamatia este procesul prin care leucocitele si anumite categorii de macromolecule ale sângelui sunt eliberate în ariile tisulare avariate*. Cel mai adesea, inflamatia se produce independent de activarea sistemului imunitar.

Suportul anatomic al reactiei inflamatorii este teritoriul *microcirculatiei*: arteriole, capilare, venule postcapilare, sunturi arterio-venoase.

În reactia inflamatorie se activeaza o diversitate de sisteme

moleculare si celulare. Ele exercita efecte vasculare marcate si determina principalele manifestari ale reactiei inflamatorii: *rubor, tumor, calor, dolor* (eritem, edem, caldura, durere), descrise de Celsus, acum 2000 de ani.

Reactia inflamatorie este declansata de o multitudine de factori de agresiune: traume mecanice, agenti infectiosi, cristale de urati, inhalarea metalelor grele, complexe imune, procese neoplazice, sindromul ischemie-reperfuzie, temperatura scazuta sau crescuta, corpuri straine inerte, agenti chimici, radiatii si se caracterizeaza prin urmatoarele modificari anatomo-functionale:

– *vasodilatatie* (hiperemie), cu cresterea fluxului sanguin spre aria afectata;

– *cresterea permeabilitatii vasculare locale*, datorita contractiei celulelor endoteliale ale capilarelor lezate, sub actiunea histaminei si a chininelor. In conditii normale, endoteliul este relativ impermeabil pentru proteine, iar schimbul limitat între compartimentul vascular si cel extravascular se face prin celulele endoteliale si prin jonctiunile dintre celulele endoteliale. In reactia inflamatorie, celulele endoteliale din venulele mici se retracta si se desprind din jonctiuni, ceea ce creeaza pori mari. Astfel, compusii plasmei trec în spatiile extravasculare;

– unii mediatori moleculari ai inflamatiei au capacitatea de a dilata capilarele si de a contracta venulele, marind presiunea hidrostatica locala si favorizând astfel extravazarea componentelor sanguine. Consecinta acestor modificari vasculare este *edemul*, însotit de durere. Pe masura ce extravazarea progreseaza, sângele intravenos se concentreaza, iar curgerea sa în noile conditii hemodinamice locale, încetineste. La nivelul leziunii endoteliale se produce *aderenta si agregarea plachetelor sanguine*, urmata de *aderenta eritrocitelor* si *leucocitelor*, care desavârsesc procesul coagularii sanguine;

– în focarele cu avarie tisulara severa, curgerea sângelui înceteaza si se produce *staza sanguina.* Spre deosebire de tromboza (datorata obturarii vasului cu un cheag sanguin), staza sanguina este un proces reversibil si dureaza minute, ore sau zile, în functie de intensitatea agresiunii;

– celulele endoteliale nu sunt numai substratul modificarilor de permeabilitate. Dupa activare, ele secreta PAF, un fosfolipid care activeaza plachetele, dar se fixeaza si pe leucocitele marginale, marind aderenta lor la endoteliu;

– celulele endoteliale produc IL-1 si tromboplastina (activatoare a trombinei);

– evenimentul celular esential care are loc într-un proces inflamator este *migrarea leucocitelor*, principalii efectori ai reactiei

inflamatorii.

Diapedeza

Venulele post-capilare sunt situsul primar la nivelul caruia mediatorii vasculari(histamina, serotonina, bradichinina, anafilatoxinele, LT) induc contractia endoteliala, dar si situsul la care leucocitele margineaza ca raspuns la chimioatractanti si parasesc patul vascular.

Migrarea leucocitelor în aria tisulara avariata este consecinta *activarii celulelor endoteliale vasculare* si cresterii permeabilitatii vasculare. Activarea celulelor endoteliale semnifica exprimarea moleculelor de suprafata, necesare aderentei celulelor inflamatorii circulante si eliberarea citochinelor proinflamatorii si a agentilor vasoactivi. Primele leucocite care migreaza în focarul inflamator sunt PMNN.

Populatia totala de neutrofile circulante în sângele periferic este alcatuita din doua subpopulatii:

– cele care circula în *curentul axial* (circa jumatate din numarul total al PMNN circulante);

– cele care circula în *zona marginala* a torentului sanguin si se deplaseaza încet, în contact cu endoteliul vascular.

În conditii normale, PMNN adera foarte rar la endoteliul vascular, dar consecutiv unei leziuni, marginatia leucocitelor se intensifica. In cazul unei infectii, sau a unor leziuni, celulele tisulare secreta citochine (IL-1, TNF α). Citochinele stimuleaza celulele endoteliale capilare sa expuna pe suprafata lor, molecule speciale denumite *selectine*.

Selectinele sunt o familie de lectine din categoria adezinelor, care mediaza contactul selectiv dintre celule. Familia cuprinde selectinele L, P si E. Adezinele L sunt *constitutive*, iar cele din clasele P si E sunt *adaptative*, adica se exprima intens pe suprafata luminala a celulelor endoteliale, a leucocitelor sau a plachetelor, ori de câte ori tesutul este expus unei agresiuni. Celulele endoteliale au o rezerva interna de selectine, pe care o mobilizeaza si o expun la suprafata, în decurs de câteva minute dupa actiunea stimulului inflamator.

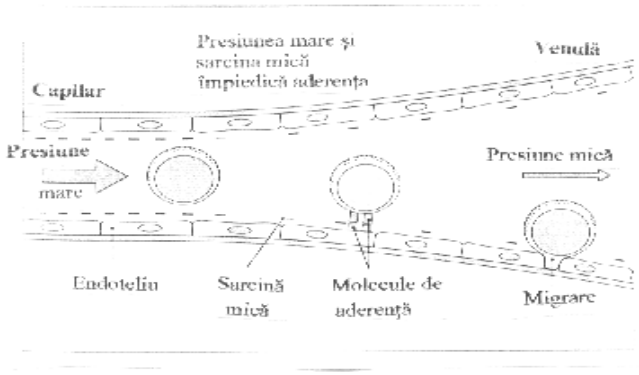


Fig. 110. *Migrarea leucocitelor* prin endo-teliu. Leucocitele circu-lante în patul vascular pot interactiona cu en-doteliul venulelor prin-tr-un set de molecule de aderenta. În venule, pre-siunea sângelui este mica, sarcina electrica a su-prafetei endoteliului este redusa si se exprima selectiv moleculele de aderenta (dupa Roitt, 1997).

S*electinele E* (endoteliu) se exprima pe celulele *endoteliale* activate de mediatori ai reactiei inflamatorii (IL-1, TNF-α), eliberati de celulele tisulare ca raspuns la leziune, infectie ori ischemie. Ele leaga specific glucidele exprimate pe leucocite, asemenea selectinei L.

Selectina P este o glicoproteina transmembranara (140 kD) exprimata atât pe *celulele endoteliale* sub actiunea stimulilor inflamatori, cât si a *plachetelor*. Este depozitata în granulele ambelor tipuri de celule si este rapid translocata la suprafata, unde mediaza aderenta prin legarea glucidelor specifice ale celulei tinta. Dupa activarea plachetelor sub actiunea trombinei, IL-1, TNF-α sau a radicalilor O_2, selectina P se redistribuie rapid pe suprafata celulelor.

Selectina L (β 2-integrina) se gaseste pe suprafata celor mai multe *leucocite* circulante: limfocite, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte doua tipuri, selectina L este exprimata *constitutiv* pe suprafata celulelor. Rolul ei primar consta în medierea aderentei limfocitelor T neangajate, de celulele endoteliale, în recircularea lor fiziologica spre ganglionii limfatici, dar functioneaza si ca mediator al tranzitului leucocitelor în situsul inflamator. În 1994 s-a aratat ca selectina L mediaza chiar interactiunea dintre leucocite: neutrofilul imobilizat pe endoteliul vascular, poate deveni substrat aderent pentru alte neutrofile. Interactiunea neutrofil/neutrofil este complet blocata de AMC anti-selectina L. Selectina L este eliminata rapid de pe suprafata leucocitelor activate, fiind clivata prin proteoliza la situsul proximal

membranei si de aceea, nivele crescute ale selectinei L se gasesc în plasma pacientilor cu focare inflamatorii infectioase, la pacientii leucemici si la cei cu SIDA.

Molecula de selectina, indiferent de specificitatea ei de legare, are trei domenii functionale:

– *domeniul membranar* COOH terminal, cu rolul de a ancora molecula;

– *domeniul modular*, alcatuit dintr-un numar variabil de secvente modulare, fiecare de circa 60 de aminoacizi, ce se gasesc si în proteinele ce leaga complementul, formeaza cea mai mare parte a moleculei;

– *domeniul lectinic* si secventa repetata a EGF, cu omologie de peste 60% a aminoacizilor pentru toate cele 3 tipuri de selectine, localizat la extremitatea libera a moleculei, are rolul de a lega liganzii glucidici ai selectinei specifice, în prezenta ionilor de Ca^{2+} .

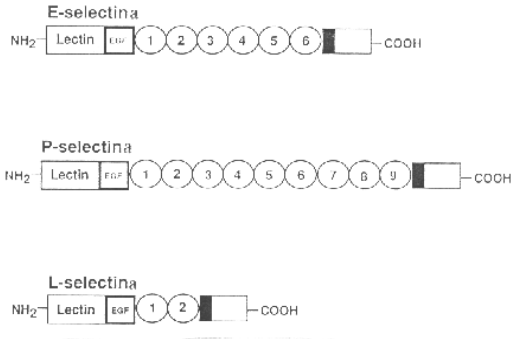


Fig. 111. Structura *selectinelor* E, P si L. *Selectina E* se exprima pe celulele endoteliale activate. *Selectina P* este o glicoproteina transmembranara de circa 140 kD. Dupa activare sub actiunea trombinei, selectina P este redistribuita rapid pe suprafata plachetelor. *Selectina L* se gaseste pe cele mai multe limfocite umane circulante, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte doua, selectina L este exprimata constitutiv pe suprafata celulelor. Dupa activare, limfocitele si neutrofilele elibereaza selectina L. Domeniul lectinic si secventa repetata EGF sunt identice în proportie de peste 60%, la cele trei selectine. Modulele selectinelor au o lungime de circa 60 de aminoacizi si contin 6 resturi cisteinil.

Leucocitele marginale adera de moleculele de selectina ale endoteliului capilar. Interactiunea selectina-PMNN este specifica si este initiata de legarea cu mica afinitate a leucocitelor de endoteliul activat, ceea ce induce o *miscare de rostogolire* a leucocitului pe suprafata epiteliului. Miscarea de rostogolire este convertita în *interactiunea stabila* a leucocitului cu suprafata endoteliului, prin intermediul selectinelor L ale suprafetei leucocitare. Astfel, leucocitele sunt imobilizate. Consecutiv aderentei la endoteliu, leucocitul initiaza

migrarea prin endoteliu. Neutrofilul îsi extinde pseudopodele la jonctiunea dintre celulele endoteliale ale capilarului si se deplaseaza în acest spatiu prin miscari amoeboidale, apoi penetreaza membrana bazala a capilarului si patrunde în tesut. Nu toate leucocitele care se rostogolesc la contactul cu endoteliul, vor parasi patul vascular. Unele se elibereaza din conexiunea cu endoteliul si reintra în circulatie. Leucocitele preactivate, cu o disponibilitate înalta pentru aderenta, nu necesita treapta de rostogolire si se opresc foarte repede dupa ce au interactionat cu endoteliul vascular. Procesul migrarii leucocitelor din lumenul vascular se numeste *diapedeza*. Migrarea este usurata de proteazele pe care leucocitul le secreta (elastaza, colagenaza), enzime care hidrolizeaza substanta cimentanta dintre celulele endoteliale si lizeaza membrana bazala.

Molecula cu un rol esential în motilitatea leucocitelor este *actina*, care formeaza 50% din totalul proteinelor celulare. In celula aflata în repaus, actina polimerizata formeaza o retea continua sub membrana citoplasmatica, având rol esential în pastrarea formei si în ancorarea ei de integrinele din mediul extracelular. In leucocitul activat, reglarea raportului dintre actina monomera si polimerizata favorizeaza deformarea celulei si trecerea prin spatiul endotelial îngust.

Chimiotaxia

Odata ajunse în spatiul extravascular, deplasarea leucocitelor spre celulele lezate, spre agentul infectios sau iritant, este controlata de factori chimiotactici.

Capacitatea unui fagocit de a recunoaste si de a raspunde la un gradient chimic printr-o miscare orientata se numeste *chimiotaxie*.

Migrarea directionata a leucocitelor este indusa de moleculele chimiotactice. Chimiotaxia trebuie deosebita de *chimiochineza,* care semnifica intensificarea miscarilor întâmplatoare, neorientate. Unii mediatori ai inflamatiei (histamina) sunt chimiochinetici, dar nu sunt chimiotactici.

Cei mai importanti factori chimiotactici sunt C3a si C5a, eliberati în cascada de activare a complementului, sub actiunea hidrolazelor tisulare sau a proteazelor bacteriene din focar. C5a este atractant pentru neutrofile si macrofage. Cele doua anafilatoxine induc degranularea mastocitelor, care elibereaza factorii ce modifica conditiile de vascularizatie locala si factorii chimiotactici pentru macrofage.

Alti factori atractanti ai leucocitelor sunt derivati ai cascadei de activare a complementului (C3b) sau sunt produsi prin coagulare si fibrinoliza, sunt limfochine, factori sintetizati de fibroblaste, fragmente de colagen, peptide bacteriene (catena peptidica la procariote este initiata

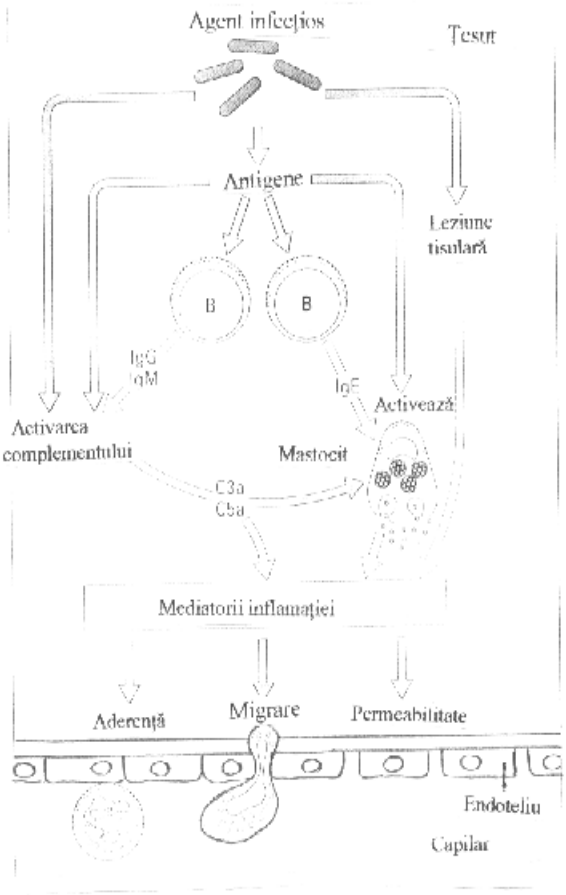
cu un rest de formil-metionil).

Neutrofilele, monocitele si macrofagele sunt atrase de concentratii foarte mici (1 nM) de peptide bacteriene (cu rest de formil-metionil).

Factorii chimiotactici sunt generati în focarul inflamator si difuzeaza spre capilarele locale.

Sub actiunea factorilor chimiotactici, leucocitele traverseaza endoteliul vascular si ajung în focarul inflamator. Ele au receptori pentru peptidele N-formil-metionil, pentru C3b, pentru regiunea Fc a moleculei de Ig. Neutrofilele din focarul inflamator sintetizeaza leucotriena B4. Monocitele, neutrofilele, eozinofilele au receptori pentru leucotriena B4, astfel încât primele neutrofile care ajung în focarul inflamator induc imigratia altora. Neutrofilia initiala induce neutrofilie.

În focarul inflamator, leucocitele elibereaza produse de catabolism sau se lizeaza si elibereaza enzime si mediatori ai reactiei de inflamatie. Aceste componente, alaturi de factorii de coagulare si de componentele complementului, amplifica procesul inflamator.



mastocitele elibereaza me-diatorii granulari (PG si LT). Mediatorii induc inflamatia locala si orien-teza migrarea leucocitelor (dupa Roitt, 1993).

Alaturi de neutrofile, în focarul de inflamatie vin monocite, limfocite si chiar eritrocite, daca leziunea vasculara este ampla.

Monocitul circulant, în conditii obisnuite, în absenta stimulilor chimiotactici, intra în tesuturi pentru a deveni *macrofag tisular rezident*. Sub actiunea stimulilor chimiotactici, trecerea monocitelor circulante în tesuturi, se amplifica.

Majoritatea mononuclearelor dintr-un focar inflamator provin *din monocitele circulante*, originare în maduva oaselor.

A doua sursa de monocite sunt cele rezultate prin *diviziune*, iar cea de a treia, sunt *mononuclearele rezidente în tesuturi*, cu viata lunga, care sub actiunea factorilor chimiotactici se mobilizeaza si se

deplaseaza în focarul inflamator. Ele se gasesc în special în focarele inflamatoare cronice.

Tipul celular dominant din focar variaza mult, în functie de natura stimulului antigenic si dupa tipul de reactie inflamatoare pe care o declanseaza: *acuta* sau *cronica.*

Tipuri de reactii inflamatorii

Reactiile inflamatorii *acute* se caracterizeaza printr-o evolutie rapida într-o perioada scurta de timp, deoarece fortele de aparare ale organismului neutralizeaza agentul invadator si curata rapid focarul reactiei. Aceste focare contin exudat vascular, leucocite (în special PMNN), iar la periferie se gasesc celule fagocitare mononucleare si fibrina. Focarul are o cavitate centrala plina cu PMNN vii si moarte, celule invadante si resturi celulare. Centrul focarului este purulent. În final, focarul inflamator este sterilizat, iar regenerarea tisulara (cicatrizarea) progreseaza pâna la vindecare. Regenerarea tisulara este rezultatul proliferarii fibroblastelor si a sintezei colagenului. Daca antigenul este inert, zona focarului este delimitata de un inel fibros. In timpul proliferarii, fibroblastele produc mucopolizaharide acide, ce neutralizeaza efectele unor mediatori chimici eliberati de mastocite si de bazofile.

Reactiile inflamatoare *cronice* sunt determinate de persistenta stimulului antigenic. Ele prezinta aceleasi 4 semne cardinale, dar participantii celulari si moleculari sunt partial diferiti.

Focarele inflamatorii cronice se caracterizeaza totdeauna prin infiltrarea *limfocitelor T si a macrofagelor.*

Macrofagele sunt cele mai importante celule ale focarului. Ele curata teritoriul, ingerând resturile de celule avariate, ingera agentul patogen invadator, produc diferiti mediatori ai inflamatiei (radicalii O_2, enzime lizosomale, proteaze, citochine) si stimuleaza raspunsul imun, pentru ca au rolul de a prezenta antigenul, limfocitelor din focar.

Formele extreme de inflamatie cronica produc *granuloame*. Exemplul clasic este *granulomul tuberculos*. Intr-un astfel de granulom, macrofagele si limfocitele sunt cele mai abundente. Macrofagele au forme particulare, de *celule gigante* provenite prin fuziune si de celule *epitelioide* aplatizate, dar nu fagociteaza. Macrofagele predomina în zona centrala a granulomului, iar limfocitele sunt periferice.

Focarul de inflamatie cronica este produs în primul rând de microorganismele infectioase, rezistente la actiunea efectorilor

sistemelor de aparare: *M. tuberculosis, M. leprae, L. monocytogenes, Brucella, Salmonella, Legionella, Chlamydia.*

În al II-lea rând, focarele de inflamatie cronica sunt generate de *autoantigene*. In starile patologice cu substrat imunitar (maladiile autoimune), generarea focarelor de inflamatie este inevitabila, pentru ca organismul nu poate sa elimine în totalitate, propriile antigene. Autoantigenele, dar si complexele imune, devin stimulii reactiilor inflamatorii cronice, iar la rândul lor determina eliberarea unor noi cantitati de autoantigene.

În al treilea rând, *adjuvantii* folositi pentru imunizarile experimentale (uleiul mineral din adjuvantul Freund complet sau incomplet, fosfatul de Ca, de Al) persista îndelung si induc formarea granuloamelor.

Mediatorii reactiei inflamatorii

Factorii mediatori ai reactiei inflamatorii sunt produsi în cascada de activare a complementului, în limfocite, monocite, granulocite, mastocite, plachete, hepatocite. Ei determina manifestarile reactiei inflamatorii. Principala manifestare este alterarea fluxului sanguin si a permeabilitatii capilare. Actiunea lor se manifesta la nivelul vaselor mici din zona focarului. C3a si C5a nu au numai actiune chimiotactica, ci determina si efectul direct de contractie a muschilor netezi. Ambele induc degranularea mastocitelor, cu eliberarea histaminei. In prima faza, histamina are efect *vasoconstrictor*.

Mastocitele sunt celule din tesutul conjunctiv, mai numeroase în imediata vecinatate a vaselor sanguine. Ele sunt activate direct de moleculele de anticorpi citofili (în special IgE), de C3a si de C5a. In faza a doua, histamina este *vasodilatatoare* si produce prabusirea tensiunii arteriale. Deoarece reproduc manifestarile reactiilor anafilactice prin intermediul histaminei, C3a si C5a se numesc *anafilatoxine*. Mastocitele au receptori membranari pentru cele doua polipeptide. Dupa activare, în mastocite se produce un influx de Ca^{2+} si cresterea nivelului AMPc. Concomitent cu degranularea, se elibereaza fosfolipaza A_2, care scindeaza *acidul arachidonic* din fosfolipidele membranare. Acidul arachidonic este convertit în compusi icozanoidici (cu 20 de atomi de C): *prostaglandine* (PG) si leucotriene (LT). PG si LT maresc permeabilitatea capilara. Granulatiile mastocitelor contin histamina, enzime proteolitice, heparina, factori chimiotactici pentru monocitele sanguine, macrofagele tisulare, pentru neutrofile si eozinofile.

Macrofagele sunt retinute si activate în focarul inflamator, de

limfochine: MIF (factorul inhibitor al migrarii) si MAF (factorul de “armare” a macrofagelor). Macrofagele ramân celulele esentiale ale focarului inflamator Dupa activare, ele secreta urmatoarele categorii de mediatori:

– enzime *lizosomale* care fluidizeaza substanta fundamentala a tesutului conjunctiv si usureaza deplasarea celulelor (colagenaza, elasataza, hialuronidaza);

– *compusi cu rol de aparare* antibacteriana (lizozim, beta-lizina, arginaza) si antivirala (interferon), componente ale complementului;

– *factori reglatori* ai reactivitatii tisulare (IL-1, mediator al interactiunii macrofag-limfocit);

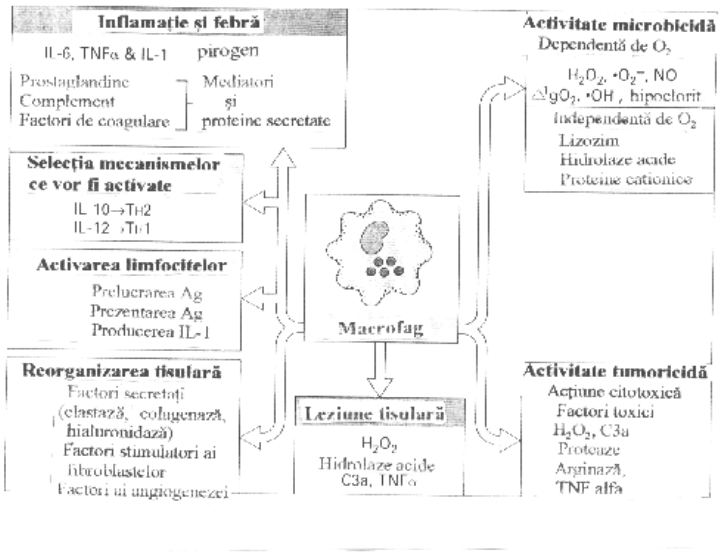


Fig. 113. *Rolul central al macrofagului în imunitate si în inflamatie*. Macrofagele si produsele lor au rol important atât în inducerea procesului inflamator, cât si în reorganizarea si repararea tesutului (stânga). Functiile efectoare ale macrofagului (dreapta) pot cauza avaria tisulara, ca în cazul reactiilor de hipersensibilitate (dupa Roitt, 1993).

– factori cu efect la distanta, asupra maduvei osoase, stimulând diferentierea neutrofilelor si asupra SNC;

– H_2O_2, care produce leziuni tisulare;

– factori cu actiune microbicida si tumoricida.

Arginaza este o proteina sintetizata si eliberata de macrofagele activate. Are efect litic asupra unor celule maligne.

Rolul citochinelor în procesul inflamator

Rolul patologic al *citochinelor* în infectie a fost clar evidentiat în situatia letala, denumita *socul septic* produs de bacteriile Gram negative. Efectul patologic ar fi datorat eliberarii endotoxinei si inducerea sintezei unei varietati de *citochine proinflamatorii* (activatoare ale procesului inflamator): *IL-2, IL-6* si *TNF*. Aceste citochine induc sinteza altor mediatori: citochine chimiotactice (IL-8), PG si LT derivate din lipide, molecule endoteliale de aderenta celulara. Consecinta sintezei acestei diversitati de molecule proinflamatorii este scaderea marcata a functiei cardiace, scaderea presiunii sanguine, staza sanguina datorita formarii trombilor leucocitari. Aceste schimbari produc insuficienta organelor majore si sfârsitul letal. }ocul septic este o situatie acuta, dar acelasi set de citochine proinflamatorii sunt implicate în patologia bolilor cronice infectioase, ca leproza, tuberculoza, infectia periodontala.

Citochinele proinflamatorii au activitati biologice foarte asemanatoare. Toate sunt factori *pirogeni endogeni* si cresterea temperaturii corpului pe care o induc, pare sa stimuleze activitatea antibacteriana a leucocitelor. Aceleasi citochine sunt esentiale pentru inducerea raspunsului de “faza acuta”, care este parte integranta a apararii înascute fata de microorganismele infectioase: amiloidul seric A, proteina care leaga manoza, a caror sinteza creste de peste 1000 de ori sub actiunea citochinelor proinflamatorii. Functia lor este de a opsoniza celulele bacteriene, usurând astfel fagocitoza.

Citochinele proinflamatorii induc sinteza *selectinelor* (E) pe suprafata celulelor endoteliale, care recunosc antigenele leucocitare si determina fenomenul de *încetinire a miscarii* si de rostogolire a leucocitelor pe suprafata endoteliului, la situsul inflamator. Alte molecule endoteliale vasculare sunt cele de aderenta intercelulara (ICAM). Acestea leaga cu afinitate înalta contrareceptorii suprafetei leucocitare (β 2-integrine). Interactiunea dintre integrinele leucocitare si ICAM determina oprirea leucocitelor si trecerea lor în spatiul extravascular prin procesul de *diapedeza*.

IL-1, IL-6 si TNF sunt protectoare, dar starea febrila înalta si prelungita, produce leziuni tisulare. Celulele mezenhimale, adica ale tesutului conjunctiv (fibroblaste, osteoblaste, condrocitele cartilajului articular), cu rol important în producerea si turnover-ul matricei extracelulare, sub actiunea prelungita a IL-1 si a TNF, îsi pierd capacitatea de sinteza a matricei extracelulare (colagen), dar sintetizeaza o categorie de enzime (*matrixine*, din care fac parte

colagenaza si elastaza), care hidrolizeaza componentele matricei, consecinta fiind pierderea matricei. De aceea, cele 3 citochine sunt mediatori esentiali ai manifestarilor patologice

În procesul inflamator actioneaza semnale pozitive si negative. Citochina anti-inflamatorie este IL-1ra (receptor antagonist), care se leaga de receptorul pentru IL-1 si determina efect antagonic, de inhibitie a activitatii celulelor sensibile. Alte citochine anti-inflamatorii sunt IL-4, IL-10, IL-13, care inhiba sinteza proteica în macrofage.

Reactantii de faza acuta

Reactia de faza acuta este parte integranta a apararii înascute, fata de microorganismele infectioase si este mediata de o serie de proteine, a caror sinteza se amplifica brusc sub actiunea citochinelor proinflamatorii.

β-*lizina* este o proteina cationica, termostabila (g m = 6000 D). Se gaseste în plachete si în umorile organismului. Omoara celulele bacteriene în câteva minute.

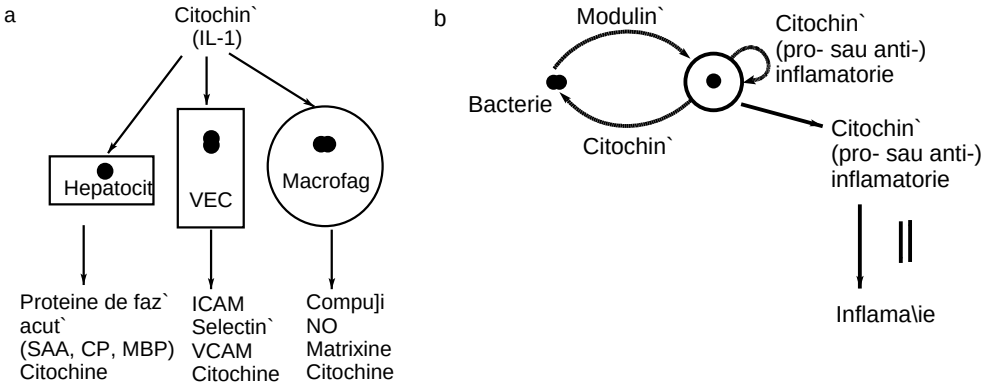


Fig. 114. **a**. Spectrul de proteine, enzime, receptori de aderenta si mediatori lipidici, pe care îi sintetizeaza diferite tipuri de celule ca raspuns la stimularea cu citochine proinflamatorii, ca de exemplu IL-1. SAA = amiloidul seric A; CRP = proteina C reactiva; MBP = proteina care leaga manoza; VEC = celula endoteliala vasculara; ICAM = molecula de aderenta intercelulara; VCAM = molecula de ade-renta exprimata pe celulele vasculare; **b**. *Modulinele* bacteriene (molecule care influenteaza reactivitatea imunitara) induc o retea a citochinelor, prin intermediul careia interactioneaza cu celulele gazdei. Citochinele stimuleaza sau inhiba raspunsul inflamator. Modulinele derivate din microbiota intestinala, interactioneaza cu celulele gazdei printr-o retea de citochine anti-inflamatorii. }oarecii knockout, cu deletia genei pentru o citochina anti-inflamatorie esentiala (IL-2 sau IL-10) manifesta un raspuns inflamator sever fata de modulinele microbiotei intestinale. Citochinele actioneaza nu numai ca modulatori ai

NO = oxidul nitric.

inflamatiei, dar pot interactiona direct cu bacteriile, efectul fiind inactivarea citochinelor.

Lactoferina este produsa si eliberata în focarul inflamator, de PMNN si are proprietatea de a lega Fe. Daca nu este saturata cu Fe, lactoferina inhiba cresterea bacteriilor, deoarece leaga Fe, un element esential al cresterii celulelor bacteriene. Procesele inflamatorii sunt însotite de producerea *reactantilor de faza acuta*. Acestia sunt proteine plasmatice sintetizate în ficat, a caror concentratie sanguina creste în timpul si dupa procesul inflamator si au rol important în vindecarea leziunii. Sunt *proteine adaptative* care favorizeaza supravietuirea în perioada imediat urmatoare leziunii. Proteinele de faza acuta se sintetizeaza dupa infectii, interventii chirurgicale, arsuri, infarct miocardic. Unele cresc în timpul sarcinii si în starile neoplazice. Denumirea lor deriva din aceea ca, una dintre ele (proteina C reactiva) s-a descoperit în serul pacientilor în faza acuta a pneumoniei cu *Str. pneumoniae*. Termenul de “proteine de faza acuta” s-a pastrat si desemneaza un grup mare de proteine plasmatice, a caror concentratie plasmatica creste dupa leziuni tisulare si dupa infectii. Concentratia unor proteine plasmatice are o dinamica inversa, adica nivelul lor scade în timpul raspunsului de faza acuta (albumina).

Proteinele de faza acuta sunt sintetizate, în cea mai mare parte, în ficat. Concentratia unora creste de pâna la doua ori, iar altele înregistreaza o crestere de 1000 de ori sau chiar mai mult.

Cele mai tipice proteine de faza acuta sunt *proteina C reactiva, alfa 1-glicoproteina acida, haptoglobina, ceruloplasmina, alfa 1-antitripsina.*

Proteina C reactiva (CRP) este astfel denumita, deoarece precipita polizaharidul C (un acid teichoic cu ribitol, care contine fosforil-colina) al celulelor de *Streptococcus pneumoniae*. CRP se leaga pe suprafata acestor bacterii si mediaza fagocitoza. Activitatea opsonica a CRP este dependenta de capacitatea de a activa calea clasica si alterna a complementului. Importanta CRP ca factor opsonizant este limitata, dar are rol important în clearance-ul celulelor avariate ori moarte, de la situsul traumatismului. Face parte din mijloacele de aparare nespecifica a organismului si este cel mai semnificativ reactant de faza acuta. Se sintetizeaza în ficat si este alcatuita din 5 subunitati

polipeptidice identice, de 206 aminoacizi fiecare, asociate necovalent într-un disc cu simetrie pentamerica. Fiecare subunitate leaga un grup fosfat si doi ioni de Ca. Functia sa principala este de a forma complexe cu unele antigene exogene, în special de origine bacteriana, favorizând astfel epurarea lor. Stimuleaza activarea complementului pe ambele cai, efectul fiind opsonizarea, citoliza, fagocitoza, eliberarea anafilatoxinelor C3a, C5a etc. Nivelul seric normal al CRP este foarte scazut (0,8 mg/L, sau sub 1 μg%, adica de ordinul nanogramelor), dar creste brusc, de pâna la 1000 de ori în primele 3-4 ore si de circa 3000 de ori în 12-24 de ore, în diferite stari patologice (infectia bacteriana, traumatisme, necroza tisulara) atât în ser cât si în umori (lichid pleural, articular, LCR). Infectiile virale severe sunt asociate cu un raspuns semnificativ de faza acuta, dar infectiile virale localizate sunt mai putin stimulatoare. Nivelul maxim al concentratiei sanguine este atins la 24-48 de ore dupa producerea leziunii tisulare. CRP ar putea avea rol în supravegherea antitumorala.

Fibronectina este o molecula multifunctionala, prezenta atât în matricea extracelulara cât si în plasma. Rolul principal este acela de a media aderenta intercelulara, dar are si functia de stimulare a ingestiei particulelor nonself. Particulele tapetate cu fibronectina sunt recunoscute de receptorii de fibronectina ai fagocitelor, dar legarea nu este urmata de ingestie si de aceea fibronectina nu este considerata ca opsonina propriu-zisa. Fibronectina stimuleaza legarea particulelor opsonizate cu IgG si cu C3b, de receptorii fagocitelor, stimulând ingestia lor.

Alfa 1-glicoproteina acida (AGA) sau orosomucoidul, alaturi de α 1-antitripsina, haptoglobina si ceruloplasmina formeaza cel de *al doilea set al reactantilor de faza acuta,* a caror concentratie începe sa creasca la 12-24 de ore de la declansarea procesului inflamator, fiind unul din indicatorii esentiali pentru diagnosticul si monitorizarea infectiilor. Concentratia maxima este atinsa la 72-86 de ore.

AGA sau este o glicoproteina de 41 kD, cu o proportie peptidica de numai 58%. Concentratia serica normala este de 50-100 mg%. Rolul sau fiziologic nu este clarificat.

Determinarea cantitativa a AGA si CRP, simultana si secventiala prezinta o importanta deosebita pentru diagnosticul si monitorizarea infectiilor. Cele doua proteine ofera informatii complementare. Scaderea CRP este markerul biochimic al însanatosirii:

– concentratia crescuta a CRP si AGA normala semnifica faza de început a infectiei;

– nivelul crescut al ambelor proteine semnifica faza de mijloc a procesului infectios;

– CRP la nivel normal si AGA crescuta, semnifica faza finala a procesului infectios, dar însanatosirea nu este completa;

– Nivelul normal al concentratiei celor doua proteine denota restabilirea situatiei normale.

Haptoglobina se sintetizeaza în ficat si are rolul de a îndeparta hemoglobima libera, rezultata prin hemoliza intravasculara. Se formeaza un complex stabil, ireversibil, care este epurat rapid de hepatocite. Dupa leziunea tisulara, haptoglobina creste de 2-4 ori si se gaseste în exudatul inflamator.

Nivelele scazute de haptoglobina au semnificatie clinica dupa vârsta de un an. Nivelul scazut se poate datora insuficientei hepatice, dar la majoritatea pacientilor, cauza este hemoliza intravasculara si clearance-ul rapid al complexelor haptoglobina-hemoglobina. Nu exista o corelare cantitativa între nivelul haptoglobinei plasmatice si amploarea hemolizei, pentru ca o hemoliza minora diminua masiv cantitatea de haptoglobina. Daca pacientul este în faza acuta a unui proces infectios sau inflamator de alta natura, nivelul "normal" al haptoglobinei nu exclude diagnosticul de hemoliza.

Alfa 1-antitripsina este un inhibitor al serin-proteazei. Desi se numeste *antitripsina*, tintele sale fiziologice sunt proteazele (elastaza, colagenaza), eliberate din leucocite (si nu tripsina).

Leucocitele elibereaza proteazele în timpul fagocitozei, în *reactia inflamatorie pulmonara cronica*, iar tesutul pulmonar este lezat.

În conditii normale, activitatea proteazelor este inhibata complet de α 1-antitripsina. Sinteza hepatica a α 1-antitripsinei creste de 4 ori în reactia inflamatorie. Deficienta sintezei acestei proteine are consecinte patologice.

Pierderea elasticitatii tesutului pulmonar este rezultatul procesului de îmbatrânire fiziologica, dar deficitul α 1-antitripsinei accelereaza procesul si produce *emfizem pulmonar*, în special la fumatori. Când se întrunesc cele doua conditii, atacul de emfizem începe la 30 de ani, cu sfârsit letal la 50. Poluarea aerului sau infectiile respiratorii au efecte defavorabile la pacientii cu deficit al sintezei alfa 1-antitripsinei. În absenta acestei proteine inhibitoare, proteazele leucocitare ataca tesutul înconjurator si produc leziuni care initiaza procesul inflamator.

Ceruloplasmina este glicoproteina principala ce transporta cuprul în plasma. 80-90% din cantitatea de Cu circulant este legata de ceruloplasmina, restul fiind legat mai lax de albumina si aminoacizi. Rolul ei este de a transporta Cu la citocrom-oxidaza, vitala pentru

producerea energiei. Absenta sau diminuarea cantitativa a ceruloplasminei, produce un proces degenerativ – maladia lui Wilson. Cuprul este absorbit în cantitati excesive, dar se depune în tesuturi.

Alfa 2-macroglobulina este al II-lea inhibitor al proteazelor plasmatice, dupa α 1-antitripsina. Inhiba actiunea proteazelor în exces. Are rol în hemostaza, coagulare, fibrinoliza, activarea complementului.

Fibrinogenul se acumuleaza în focarul leziunii tisulare, în primele 7-14 zile dupa incizia chirurgicala. In prezenta enzimelor eliberate din PMN si plachete, se formeaza fibrina. Fibrina stimuleaza proliferarea fibroblastelor.

Starea febrila este un raspuns de faza acuta, care poate sa apara dupa multe tipuri de stimuli inflamatori, inclusiv în starile infectioase. Febra este produsa de actiunea IL-1 si PG asupra centrilor hipotalamici ai termoreglarii.

Un alt raspuns de faza acuta este cresterea numarului de granulocite circulante. Initial, cresterea reflecta eliberarea granulocitelor din maduva osoasa, iar ulterior semnifica productia crescuta.

Desi factorii celulari si moleculari care participa la raspunsul inflamator sunt numerosi, activitatea biologica esentiala care se desfasoara într-un focar inflamator acut este *fagocitoza*. O buna parte a moleculelor din focarul inflamator, prin efectul lor opsonizant, usureaza fagocitoza. Uneori însa, agentii patogeni infectiosi, parazitii sau celulele maligne elimina *factori chmiotactic negativi* (imunorepelenti) pentru fagocitele din focarul inflamator. Existenta lor s-a demonstrat în supernatantul unor linii celulare maligne. Factorii imunorepelenti sunt molecule mici (1-12 kD). Dupa injectarea la soarece si cobai, reduc influxul PMNN si al macrofagelor la locul inocularii celulelor de *L. monocytogenes*.

Capacitatea unor agenti patogeni, de a inhiba mobilizarea si concentrarea efectorilor celulari la locul focarului de inflamatie este unul din cele mai comune mecanisme de virulenta.

În esenta, reactiile inflamatorii declansate de factori exogeni sunt *benefice* pentru organismul gazda. Ele reprezinta un mecanism nespecific de limitare a procesului infectios si de eliminare a resturilor celulare rezultate din leziunea tisulara. Actiunea efectorilor reactiei inflamatorii pregateste terenul pentru procesele de *reparare si cicatrizare tisulara*.

Interferenta cu procesele inflamatorii are consecinte grave asupra capacitatii de aparare a organismului.

Procesele inflamatorii declansate de antigene endogene au totdeauna efecte *defavorabile* asupra organismului, deoarece produc distrugere tisulara sau chiar necroza. Raspunsul inflamator consecutiv

leziunilor tisulare provocate de infarctul de miocard, de atacul cerebral sau de transplantul de organe, prezinta un interes clinic special. Sindromul raspunsului inflamator sistemic, care se produce în asociatie cu infectia sistemica, cu arsurile extensive, cu traumatisme sau cu socul hemoragic, are de asemenea efecte defavorabile.

În concluzie, agentii infectiosi, substantele inerte sau traumatismele sunt initiatorii procesului inflamator, dar fortele de aparare specifica si nespecifica mediaza dinamica procesului inflamator. Formarea focarului inflamator este initiata de molecule si celule nespecifice. Totusi, uneori, evolutia procesului inflamator de natura infectioasa, este decisa în ultima instanta, de *amplitudinea raspunsului imun*. Acest fapt este ilustrat de existenta diferitelor grade de gravitate a infectiei cu *M. leprae*. Boala leprei prezinta forme diverse, de la *lepra lepromatoasa*, caracterizata prin existenta unor focare inflamatorii multiple, cu macrofage încarcate cu celule bacteriene, putine limfocite T în focar si un raspuns imun mediat celular de mica intensitate, pâna la *lepra tuberculoida,* caracterizata prin focare inflamatorii mai putin numeroase si macrofage cu putine celule bacteriene, un numar mare de limfocite T în focar si raspuns imun mediat celular intens.

Indepartarea antigenului este semnalul pentru terminarea reactiilor mediate de mecanismele inflamatorii celulare si pentru începerea *fazei de cicatrizare*.

Procesele fiziologice care au loc la nivelul aparatului reproducator feminin – ovulatia, luteoliza, modificarile ciclice ale mucoasei uterine si implantatia ovulului fecundat, se aseamana în multe privinte cu reactia inflamatorie clasica.

Fumatul este o sursa importanta de radicali liberi, care pot duce la activarea plachetelor si a neutrofilelor *in vivo*, cu amplificarea ratei generarii radicalilor liberi.

Capitolul 8

REACTII IMUNITARE *IN VIVO*

De cele mai multe ori, în special în procesele infectioase, reactiile imunitare au o finalitate benefica, având un rol determinant în eliminarea agentilor patogeni. Uneori, dupa contactul cu antigenele (în special moleculare), activarea functiei imunitare are rol prejudiciant, defavorabil asupra organismului, deoarece raspunsul imun se instituie drept cauza si mecanism pentru producerea diferitelor maladii (alergii, boli autoimune).

Reactiile Ag-Ac *in vivo*, cu consecinte defavorabile pentru organism, fac obiectul de studiu al unui domeniu bine conturat, denumit *Imunopatologie*.

Activarea neadecvata a functiei imunitare determina doua categorii de manifestari clinice:

a) *starile de hipersensibilitate*

b) *maladiile autoimune*

Diminuarea activitatii sistemului imunitar, genereaza o categorie speciala de manifestari clinice, cunoscute sub denumirea generica de *imunodeficiente*. Ele pot fi *înascute* (primare) sau *dobândite* (secundare).

Imunopatologia studiaza reactivitatea functiei imunitare în *starile neoplazice, reactivitatea consecutiva transplantului de tesuturi si organe, în maladiile infectioase virale, bacteriene, fungice si în maladiile parazitare.*

1. Starile (reactiile) de hipersensibilitate

Starile de hipersensibilitate sunt *reactii tertiare*, consecutive reactiilor Ag-Ac *in vivo*. Ele sunt o consecinta a faptului ca procesul de imunizare dupa contactul primar cu antigenul si generarea efectorilor imunitari (anticorpi si limfocite efectoare) nu confera totdeauna o stare favorabila, de rezistenta a organismului. Contactul primar cu antigenul creeaza, uneori, *o stare de sensibilizare* fata de antigenul respectiv. Sensibilizarea este o stare fiziologica daunatoare organismului si se

manifesta, în special dupa contactul organismului cu antigene proteice (din ou, din ser), cu antigenele din polen si mai rar dupa contactul cu antigenele corpusculare (hematii de berbec). La contactul secundar cu antigenul sensibilizant, organismul raspunde prin *starile patologice de hipersensibilitate*.

Starile de hipersensibilitate sunt consecinta unui raspuns de intensitate prea mare sau a unui raspuns imun neadecvat, care sta la originea leziunilor tisulare. Echivalentul termenului de *hipersensibilitate*, folosit în mod curent, este cel de *alergie* (*allos, ergon* = alta energie).

Termenul de *alergie* a fost introdus de von Pirquet (1906) si semnifica o reactie imunitara care se exprima cu *energie diferita* de cea normala, dupa expunerea secundara la un antigen. Ambele denumiri se refera la o reactivitate imunitara de intensitate anormal crescuta, fata de un antigen. In sens stiintific, notiunea de alergie include toate manifestarile care decurg din reactivitatea imunitara, cu o alta energie decât cea fiziologica: *reactiile hiperergice, hipoergice si anergice*.

În mod curent, alergia se defineste ca o stare de hipersensibilitate, ce rezulta din expunerea la un alergen si se distinge prin supraproductia componentelor imunitare.

Clasificarea starilor de hipersensibilitate

Starile de hipersensibilitate au fost clasificate în raport cu promptitudinea cu care se manifesta:

– *reactiile de hipersensibilitate imediata* au o dinamica rapida. Se declanseaza în câteva secunde sau minute de la contactul secundar cu alergenul si diminua rapid, în câteva ore, fara semne vizibile, cu exceptia celor foarte grave. Tesutul suport al reactiei este diferit de la o specie la alta. Aproape totdeauna va rezulta distrugerea celulei tinta. Reactiile imediate se desfasoara în tesuturi vascularizate si, de obicei, se manifesta local, dar pot produce si efecte sistemice. *Hipersensibilitatea imediata* este cea mai raspândita dezordine imunitara la om. Este cea mai frecventa maladie cronica, ce afecteaza circa 25% din populatie în tarile dezvoltate, cu severitate variabila, de la o simpla iritare, pâna la periclitarea vietii;

– *reactiile de hipersensibilitate subacuta* sunt acelea care încep sa se manifeste dupa 1-3 ore de la contactul secundar cu antigenul si înceteaza dupa 10-15 ore. Sunt mediate de IgG sau IgM;

– *reactiile de hipersensibilitate întârziata* se evidentiaza la 1-2 zile dupa contactul secundar cu alergenul. Persista un interval de câteva zile, pâna la câteva saptamâni. Aceste reactii sunt mediate de limfocitele T si de macrofage. Nu sunt dependente de factori humorali

circulanti si de aceea se pot produce si într-un tesut nevascularizat. Singura conditie este ca tesutul sa fie situat în apropiere de sistemul vascular, pentru ca limfocitele si macrofagele sa poata migra spre locul unde a fost injectat antigenul.

Reactiile de hipersensibilitate imediata si întârziata se deosebesc prin urmatoarele trasaturi:

- mecanismul inducerii (humoral sau celular)
- dinamica desfasurarii în timp
- particularitatile manifestarilor patologice
- posibilitatea combaterii.

Gell si Coombs au definit 4 tipuri de reactii de hipersensibilitate:

- reactii de tip I: *reactiile de anafilaxie* (anafilaxia generalizata, reactiile de anafilaxie locala, denumite si stari atopice* : astmul bronsic alergic, febra de fân, urticaria, reactia Arthus, maladia serului).
- reactii de tip II: *reactii de citotoxicitate* mediate de anticorpi
- reactii de tip III: *reactiile de hipersensibilitate induse de complexele imune*
- reactii de tip IV: *reactiile de hipersensibilitate întârziata*, mediate de limfocitele T(reactia la tuberculina, brucelina, lepromina etc; dermatitele de contact, reactia de respingere a grefei).

Reactiile de tip I, II si III sunt mediate de anticorpi, iar cele de tip IV sunt mediate de celule.

Dovezi pentru *natura imunitara* a reactiilor de hipersensibiltate:

- reactiile de hipersensibilitate necesita stimularea prealabila (sensibilizarea) organismului uman sau animal cu antigenul inductor (alergenul);
- între momentul contactului cu doza sensibilizanta si momentul administrarii dozei declansatoare este necesara o perioada de timp (5-10 zile), pentru sinteza efectorilor reactiei (anticorpi) sau pentru expansiunea clonelor de limfocite. Dupa acest interval, organismul devine sensibil la declansarea starii de hipersensibilitate, numai la contactul cu acelasi alergen care a creat starea de sensibilizare sau cu un antigen înrudit, care da reactie serologica încrucisata cu alergenul inductor. Intre antigenul sensibilizant, cel declansator si starea de hipersensibilitate este o relatie specifica;
- organismele sensibilizate prezinta un raspuns imun de tip humoral sau celular. Starea de hipersensibilitate este mediata de efectorii raspunsului imun;
- reactiile de hipersensibilitate imediata se transfera prin *ser* de la un organism hipersensibil la unul sanatos. Pentru ca reactia de hipersensibilitate sa se manifeste, serul trebuie sa se injecteze într-un tesut vascularizat. Reactiile de hipersensibilitate întârziata se transfera

prin intermediul *limfocitelor* viabile.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip I

Reactiile de hipersensibilitate de tip I, denumite si *reactii anafilactice* au cea mai mare frecventa si se manifesta foarte diferit, atât în ceea ce priveste intensitatea, cât si a organului tinta al reactivitatii.

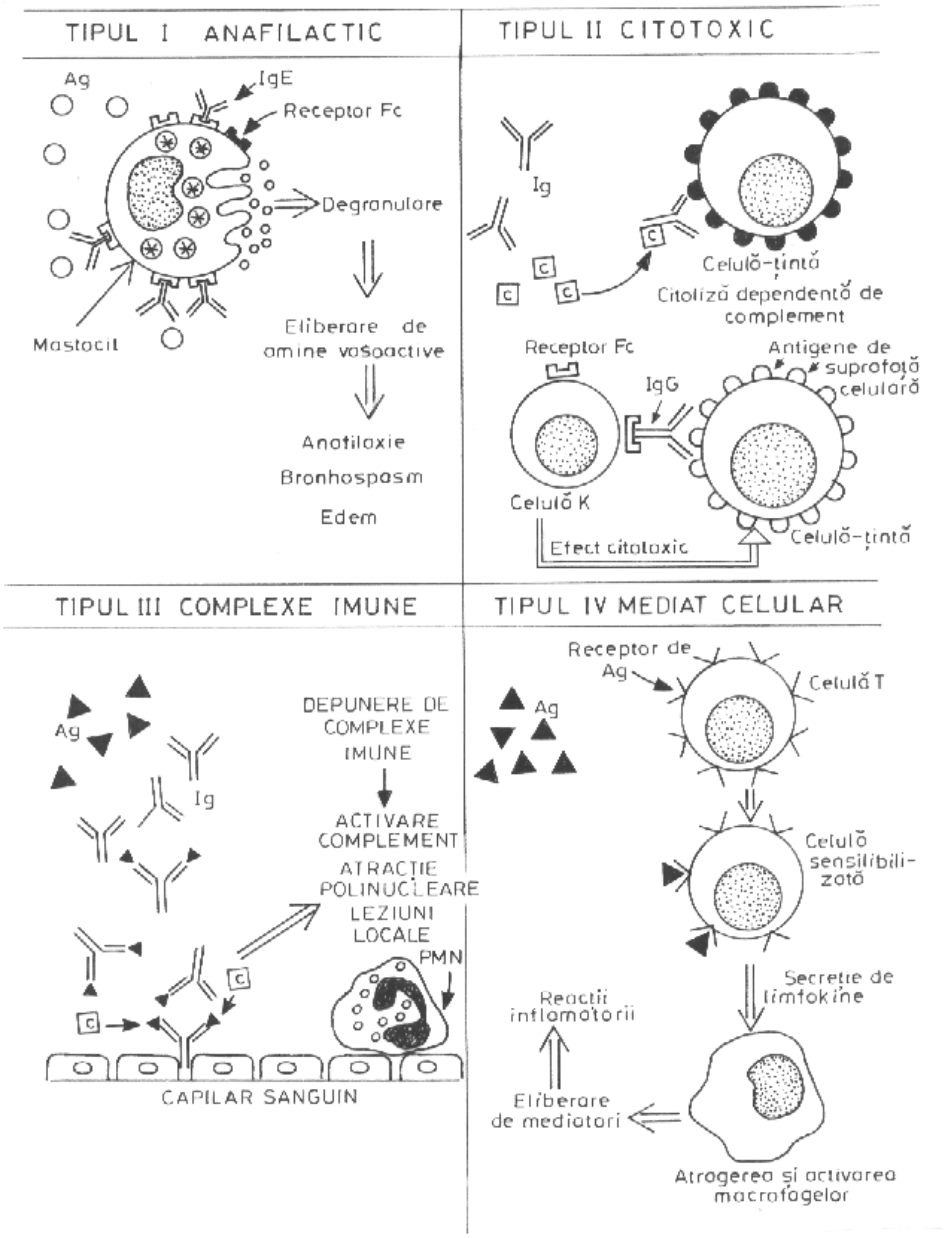


Fig. 115. Reprezentare schematica a particularitatilor de evolutie a celor patru *tipuri de reactii de hipersensibilitate*.

Declansatorii

Antigenele care induc manifestarile reactiilor anafilactice se numesc *alergene*. Ele se gasesc în polenul unor plante, în praful de casa, în veninul insectelor sau în produse alimentare. Alergenele sunt un set de antigene, stimulatoare ale sintezei de IgE. Natura lor chimica este foarte heterogena. Un studiu german recent, releva ca organismul uman vine în contact cu circa 14000 de substante chimice: unele sunt substante *alimentare*, altele sunt ingerate odata cu alimentele, fiind adaugate în *procesul industrial* al prelucrarii. O categorie larga o formeaza *substantele poluante*. Din punct de vedere chimic, alergenele sunt *glicoproteine* si *polizaharide* de origine vegetala sau animala sau molecule mici, cu rol de *haptene*.

Haptenele sunt molecule organice sau anorganice, cu greutate mica, insuficienta pentru a fi antigene, dar devin alergene dupa cuplarea lor cu macromoleculele tisulare. De cele mai multe ori, haptenele alergice sunt substante de uz farmaceutic, de 500-1000 D. Dupa legarea covalenta ireversibila cu proteinele serice, rezulta un *conjugat haptena-proteina*, cu specificitate antigenica modificata si adeseori alergic. Toate medicamentele în stare nativa, dar si derivatii lor de degradare partiala pot sa se comporte ca haptene si sa devina alergene.

Intensitatea reactiilor de hipersensibilitate este dependenta de calea de patrundere în organism, de doza, de frecventa expunerii si de caracteristicile moleculare ale alergenului. Cel mai adesea, alergenele se clasifica în functie de *calea de patrundere* în organism. In raport cu calea de patrundere a alergenelor, se disting:

- alergene *inhalate*
- alergene *ingerate*
- alergene *inoculate*

Alergenele inhalate sunt glicoproteine din polen, din fungi, din praful animalelor de casa. Greutatea moleculara nu depaseste 50 kD, deoarece moleculele mai mari nu strabat membranele mucoase ale tractului respirator. Un alergen inhalat poate determina simptome respiratorii: rinita, astm. Crizele se produc numai în prezenta alergenului. Unele alergene sunt sezoniere (polen), altele sunt perene (praful de casa).

Polenul este, din punct de vedere cantitativ, cea mai importanta sursa de alergene. Plantele din familiile *Gramineae, Compozitae, Betulaceae, Fagaceae* produc polen alergic. Toate polenurile alergice provin de la plante polenizate de vânt (anemofile). Ele produc cantitati mult mai mari de polen decât plantele entomofile si în perioada înfloririi îl

elibereaza în atmosfera. Alergenele din polen sunt glicoproteine înrudite chimic si dau reactii încrucisate. Serul imun de iepure, fata de un alergen din polen precipita o diversitate de alergene polenice.

Sporii fungilor se gasesc în aer, în cantitate de circa 5 ori mai mare decât granulele de polen, dar produc mai putine stari alergice. In regiunile temperate, numarul sporilor fungici este maxim în timpul verii si scade în sezonul rece. Alergiile sunt produse de sporii a peste 80 de genuri de fungi: *Alternaria*, *Penicillium, Aspergillus*. Singura substanta alergica de origine fungica, izolata în stare pura, este *penicilina*.

Cantitatile de alergene care patrund pe cale respiratorie, sunt foarte mici: sub 1 μg/an.

Reactiile alergice la alergenele fungice apar la 30 de minute de la expunere, iar cele toxice, la 6-8 ore dupa ingestie. Reactiile toxice nu au substrat imunologic. Micotoxinele au greutate moleculara mica (sub 1 kD) si pot fi eliminate din extractele de alergene fungice, prin dializa.

Cele mai multe particule inhalate (mai mari de 10 μm), ca de exemplu, polenul si sporii mari sunt depozitate în nazofaringe si sunt asociate cu manifestari locale, nazale si/sau oculare, denumite generic "febra de fân". Particulele mai mici de 10 μm (dar în special cele mai mici de 5 μm) sunt antrenate cu curentul de aer inspirat, în caile inferioare, unde reactiile alergice tind sa se manifeste sub forma de *astm*. Sporii fungici difera ca dimensiuni si determina reactii alergice ale tractului respirator superior si inferior.

Alergenele ingerate se gasesc în compozitia unor alimente: în ou, ciocolata, capsuni, cirese, uleiul de ficat de peste, în semintele de *Glycine max* (soia), în faina unor cereale (grâu, orz), în semintele de *Arachys hypogea* (alun de pamânt) etc. La copii, laptele de vaca si soia sunt cauzele majore ale reactiilor alergice, urmate de cereale, oua si peste. Vârsta manifestarilor este variabila: dupa primele zile de viata(fata de laptele de vaca), pâna la doi ani. La 90% din cazuri, intoleranta dispare dupa trei ani. Cele mai comune manifestari sunt voma, diareea, colicile abdominale, ce apar într-un interval variabil, de la câteva minute, pâna la 1-2 ore dupa ingestie. Alergia la laptele de vaca si la peste este mai frecventa la populatiile care consuma cantitati mari ale acestor produse.

Alergenele alimentare traverseaza lumenul intestinal, la nivelul mucoaselor digestive. Bariera mucoasei gastrointestinale este expusa la un grup heterogen de antigene. Experientele cu molecule marcate cu peroxidaza de hrean sau cu feritina, au evidentiat ca unele antigene intacte si fragmente de antigene particulate din tubul digestiv, dobândesc accesul la tesuturile limfoide ale gazdei, în special la persoanele cu deficit al sintezei de IgA. Antigenele ce ajung în contact

cu structurile limfoide ale mucoaselor, stimuleaza raspunsul imun al gazdei.

Penetrarea antigenelor la nivelul tractului digestiv se face pe doua cai:

– prin *endocitoza* de catre celulele intestinale absorbante, la polul luminal. Se formeaza fagosomi, în interiorul carora se produce digestia materialului endocitat, dar cantitati mici ramân nedigerate si sunt exocitate în spatiul extracelular, la polul bazal. Starile de hipo- sau aclorhidrie favorizeaza tranzitul proteinelor prin mucoasa intestinala.

– patrunderea antigenelor alimentare la nivelul *celulelor epiteliale M*, ce acopera placile Peyer, foarte numeroase în regiunea distala a intestinului subtire. Aceste celule functioneaza ca adevarate “sonde de antigen”, adica au capacitatea de a îngloba antigenele derivate în special din microorganisme si într-o masura mai mica, antigene de origine alimentara.

Celulele M reprezinta un sistem de avertizare timpurie pentru sistemul imunitar al organismului. Ele sunt acoperite de un strat subtire de mucus, au microvili scurti, dar au capacitatea de a endocita antigene luminale, prin mecanismul pinocitozei. Celulele M sunt diferentiate, contin lizosomi si nu degradeaza antigenele pe care le pinociteaza, dar le transfera macrofagelor din foliculii subiacenti.

Desi au evoluat ca o modalitate strategica protectoare fata de antigenele luminale, totusi celulele M reprezinta poarta de intrare pentru microorganismele patogene, care la acest nivel îsi dobândesc accesul la tesuturile subiacente mucoasei.

Studiile electrono-optice cu molecule marcate cu peroxidaza de hrean, au aratat ca acestea sunt transportate din lumenul intestinal si ajung în spatiul subiacent celulelor M, unde se gasesc limfocite si macrofage. Se stimuleaza astfel raspunsul imun local. Structurile limfoide asociate mucoaselor constituie prima *bariera de protectie* fata de antigenele tractului digestiv. Uneori, cantitatile relativ mari de antigene de origine bacteriana si alimentara, nu sunt anihilate local, de structurile limfoide ale mucoaselor si trec în mediul intern, ajungând la cea de a II-a bariera majora de protectie fata de antigene, care este *ficatul*. Circa 30% din numarul total de celule ale ficatului au capacitatea de a fagocita si epureaza sângele adus de vena porta din teritoriul digestiv.

Antigenele inoculate sunt proteine din veninul de insecte, în special *Hymenoptere* (albina, viespe), care contine 7-10 antigene. Alergenele din venin sunt diferite forme ale fosfolipazei A. Veninul de albina contine fosfataza acida, hialuronidaza, dopamina si norepinefrina si un peptid care produce degranularea mastocitelor.

Serurile imune obtinute pe diferite specii de animale (heteroantiseruri), dupa injectare la om, adeseori activeaza raspunsul imun al organismului receptor. Multi diabetici tratati cu *insulina* de origine animala sau cu insulina sintetizata în celule reprogramate prin metodele ingineriei genice, sintetizeaza anticorpi anti-insulina.

Agentii farmacologici, administrati în scop terapeutic sau diagnostic, pot cauza o varietate de dezordini imunitare, deoarece actioneaza ca haptene care se cupleaza cu diferite proteine tisulare, conferindu-le imunogenitate. Legarea covalenta a unui medicament ori a unui metabolit reactiv derivat prin metabolizarea lui, de o macromolecula, creeaza un *conjugat haptena-macromolecula*, inductoare a raspunsului imun specific. Legarea covalenta a celor doua molecule se numeste *haptenare*.

Se descriu doua tipuri de haptenare:

– *haptenarea directa* a celulelor (a moleculelor membranare) si a moleculelor extracelulare, sub actiunea compusilor chimici cu reactivitate nativa (intrinseca). De exemplu, penicilinele de semisinteza (benzil-penicilina, cefalosporinele), dar si alte medicamente se cupleaza cu diferite proteine serice, formând conjugate cu functie de alergene. Circa 10% din moleculele de penicilina injectata, se leaga covalent prin gruparea $-NH_2$, de proteine plasmatice sau membranare. Celula poate lega mii de haptene β-lactamice, în câteva minute dupa tratament.

– *haptenarea indirecta* a moleculelor membranare sau libere, cu derivatii rezultati din catabolizarea partiala a unor molecule, care în stare nativa sunt putin reactive sau areactive.

Metabolizarea are loc în hepatocite, cheratinocite (si în alte celule) si poate crea intermediari reactivi ce formeaza legaturi covalente cu molecule carrier.

Uneori, catabolismul medicamentelor este concomitent cu sinteza proteica. Se produce haptenarea moleculelor în cursul sintezei (haptenare interna) si pot fi expuse ca antigene pe suprafata celulei.

a = inel β-lactamic
b = inel tiazolidinic
Dupa fisiunea inelului β-lactamic rezulta gruparea peniciloil, principalul inductor al reactiilor anafilactice la om.

Metabolitii reactivi pot fi secretati în spatiul extracelular si se leaga cu proteine extracelulare.

Unii indivizi sunt predispusi la reactiile alergice fata de diverse medicamente, în special antiinfectioase. Daca un individ manifesta

fenomene alergice fata de un compus antimicrobian, riscul alergiei fata de o alta clasa de compusi farmacologici creste de 9 ori. Circa 10% dintre adulti sunt alergici fata de o clasa de compusi si intra în categoria celor cu risc crescut fata de alti compusi farmacologici.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip 1, induse de medicamente, se manifesta variat: anafilaxie, urticarie, angioedem.

Unele substante pot produce mai mult de un tip de reactie, la un organism sensibil. De exemplu, penicilina poate cauza o reactie anafilactica de tip I, o anemie hemolitica datorata reactiei citotoxice de tip II, dezordini functionale de tip III cu complexe imune sau o reactie de hipersensibilitate întârziata.

Reactiile de hipersensibilitate apar, de cele mai multe ori, în tesuturile bogate în mastocite: tegument, mucoase, mucoasa linguala, plamân, tractul gastrointestinal.

Daca reactia de hipersensibilitate imediata este localizata în mucoasa nazala si în conjunctiva oculara, simptomele includ rinoree, lacrimare, stranut, congestie nazala, cresterea numarului eozinofilelor în sânge. Titrul IgE seric poate sa creasca sau sa ramâna scazut.

Daca reactia de hipersensibilitate imediata este localizata în bronhii, manifestarea clinica este astmul alergic, caracterizat prin scurtarea si îngreunarea respiratiei.

Mediatorii reactiei de hipersensibilitate imediata de tip I

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip 1 se datoreaza sintezei unor izotipuri de anticorpi cu proprietati particulare.

Din punct de vedere functional, anticorpii sunt *conventionali* si *citofili*.

Anticorpii *conventionali* (Ig A, IgG, IgM) din ser se detecteaza *in vitro*, prin reactia de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului. *In vivo*, anticorpii conventionali se combina cu antigenul si îl neutralizeaza. Reactiile de hipersensibilitate de tip 1 se datoreaza sintezei anticorpilor citofili, cu proprietati functionale particulare.

Anticorpii *citofili* au proprietatea de a se fixa pe suprafata unor celule care au receptori pentru regiunea Fc si în primul rând pe mastocite, dar si pe bazofile, eozinofile, macrofage. Nu produc reactii secundare de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului.

Anticorpii citofili declansatori ai reactiilor de hipersensibilitate imediata se numesc *reagine*, deoarece produc modificari ale reactivitatii tisulare: maresc permeabilitatea vasculara prin intermediul histaminei, eliberata din mastocite. La om, reaginele majore sunt IgE si IgG_4. IgE este termolabil (se inactiveaza la 56^{o}, timp de 30 de minute), iar IgG_4 este termostabil. Ambele izotipuri se sintetizeaza dupa imunizari

naturale. IgE nu traverseaza bariera placentara. Timpul de înjumatatire este de doua zile.

Sinteza lor se face dupa mecanismul clasic: dupa ce alergenul vine în contact cu mucoasele (respiratorie sau digestiva), penetreaza pelicula de mucus si celulele epiteliale, este fagocitat de macrofage, prelucrat si prezentat în asociatie cu moleculele CMH II, limfocitelor Th. Limfocitele Th sintetizeaza IL-2 care produce expansiunea clonala a limfocitelor B. Sub actiunea stimulatoare a IL-2, limfocitele B se transforma în plasmocite ce sintetizeaza IgE.

La persoanele normale, sinteza IgE este supresata de limfocitele Ts, iar concentratia de IgE seric variaza între 17-450 ng/ml, adica 0,002% din totalul cantitatii de imunoglobuline serice. La indivizii *atopici* (cu predispozitie genetica pentru manifestarea reactiilor alergice), dupa contactul cu o doza mica de alergen, aproape totdeauna se sintetizeaza IgE, iar titrul seric creste de 1000 de ori. Nivelul seric crescut al IgE este o modalitate de diagnostic al starilor alergice, dar nivelul normal al IgE nu exclude starea alergica.

IgE se sintetizeaza local, în structurile limfoide, la poarta de intrare a antigenului, în plasmocitele din corionul mucoasei. Excesul de IgE trece în circulatie si se leaga pe receptorii pentru Fc γ de mare afinitate ai bazofilelor, neutrofilelor, ai celulelor endoteliului vascular, ai celulelor epiteliale alveolare pulmonare. Sângele transporta IgE la masocitele tisulare din tot organismul. IgE fixat pe celule reprezinta o proportie importanta din IgE total.

Desi IgE liber (din ser) are timpul de înjumatatire de doua zile, IgE fixat pe suprafata celulelor este foarte stabil. Mastocitele ramân sensibilizate luni de zile, datorita afinitatii foarte înalte a receptorilor lor pentru Fc al IgE. În stare legata, IgE este protejat de atacul proteazelor.

Celulele mediatoare ale reactiilor de hipersensibilitate imediata sunt în primul rând *mastocitele* si *bazofilele.*

Bazofilele sunt celule circulante, dar pot patrunde în focarul inflamator. Mastocitele sunt celule mononucleate si au doua localizari principale:

– în tesutul conjunctiv, în special în jurul vaselor sanguine din ficat, rinichi, splina;

– în mucoasele digestive si cea respiratorie.

În creierul uman sunt doua surse de histamina: *mastocitele* si *neuronii histamiergici*. Mastocitele se gasesc în zonele cele mai vascularizate (eminenta mediana, glanda pineala, meninge) si controleaza circulatia sângelui si permeabilitatea vaselor SNC. Neuronii histaminergici sunt limitati exclusiv la nivelul nucleului *tuberomamilar* din hipotalamusul posterior. Colateralele axonale se proiecteaza în toate zonele cortexului. Astfel, sistemul histaminergic central controleaza

activitatea întregului creier.

Localizarea strategica a mastocitelor se coreleaza cu alterarile patologice care se produc la nivel vascular gastrointestinal, bronsic, cutanat, cerebral, ocular.

În citoplasma bazofilelor si mastocitelor, la microscopul electronic se observa granule electrono-dense, ce reprezinta pâna la 40% din volumul celular. Ele contin mediatori preformati, cei mai importanti fiind *aminele biogene* (histamina si serotonina).

Mastocitele contin *histamina* (amina tisulara), detectata initial în tegument. *In vivo*, histamina se sintetizeaza prin decarboxilarea histidinei, reactie catalizata de histidin-decarboxilaza (o enzima citoplasmatica) si este depozitata în granule. O celula umana contine 2-3 pg de histamina.

Histamina este larg distribuita în tesuturile organismului uman. La om, neuronii histaminergici ai SNC reprezinta o sursa nemastocitara de histamina. Histamina actioneaza asupra unei varietati largi de tipuri celulare: celule musculare netede, neuroni, celule endocrine, exocrine, celule sanguine, celulele sistemului imunitar. Efectele variate se produc prin receptori distincti: H_1, H_2, H_3.

Serotonina (5-hidroxi-triptamina) se formeaza prin decarboxilarea moleculei de triptofan hidroxilat. Mastocitele umane nu contin serotonina. Serotonina s-a izolat initial din ser (tonina din ser), deoarece are efect vasoconstrictor. Produce edem si are rol important în reactiile anafilactice.

Histidina Histamina Serotonina
(5-hidroxi-triptamina)

Mecanismul celular si molecular al reactiilor de hipersensibilitate imediata de tip I

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip 1 se desfasoara în mai multe stadii.

Faza I a este *legarea anticorpilor citofili* (IgE, care s-a sintetizat dupa contactul primar cu antigenul), de receptorii pentru Fc ε ai mastocitelor locale. Alti factori activatori ai mastocitelor sunt:

- alergenul specific sau unul înrudit cu cel inductor al sintezei IgE;
- diferite lectine
- anticorpi anti-IgE, anticorpi anti-idiotipici, anticorpi anti-receptor Fc ε;

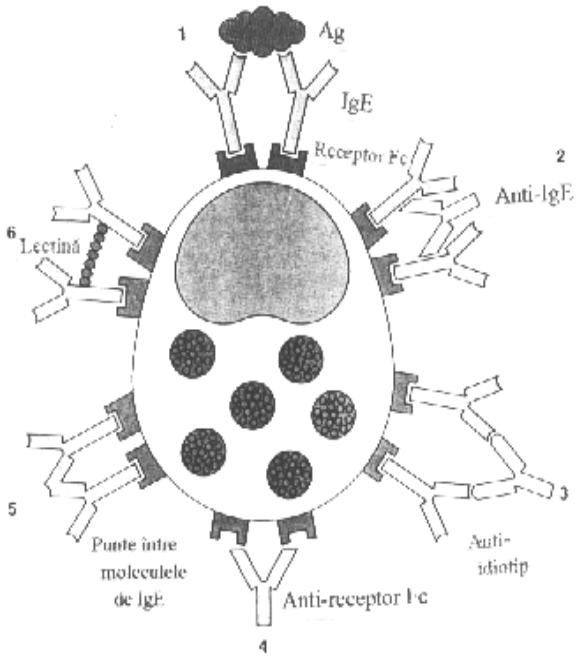


Fig. 116. *Activarea masto-citelor* este mediata de legarea încrucisata a recep-torului Fc ε. Aceasta poate fi realizata de legarea antigenului de IgE fixat pe receptorii pentru Fc ε, de anticorpii bivalenti care recunosc determinantii izo-tipici ai regiunii Fc a IgE, de anticorpii anti-idiotipici ai regiunii Fab ai IgE, de anticorpii anti-receptor care se fixeaza direct pe recep-torul pentru Fc ε, de dimerii bivalenti de IgE obtinuti cu agenti chimici de polime-rizare sau de lectinele care se leaga de resturile glu-cidice ale IgE. Antigenele si anticorpii monovalenti nu activeaza mastocitele, deoa-rece nu realizeaza legarea încrucisata a receptorilor

(dupa Roitt, 1993).

– neuropeptide endogene, fapt care explica alergia determinata de stimularea sistemului nervos
– anafilatoxinele C3a si C5a
– peptidele bacteriene ce contin formil-metionina
– agenti fizici (de exemplu, temperatura scazuta)
– diferite medicamente.

În faza a II-a se produce *activarea mastocitelor si degranularea* lor.

Alergenul declansator trebuie sa fie multivalent pentru a lega încrucisat doua molecule de IgE fixate pe celula efectoare. Dupa legarea încrucisata a receptorilor pentru Fc ε, membrana granulelor fuzioneaza cu membrana citoplasmatica si elibereaza continutul.

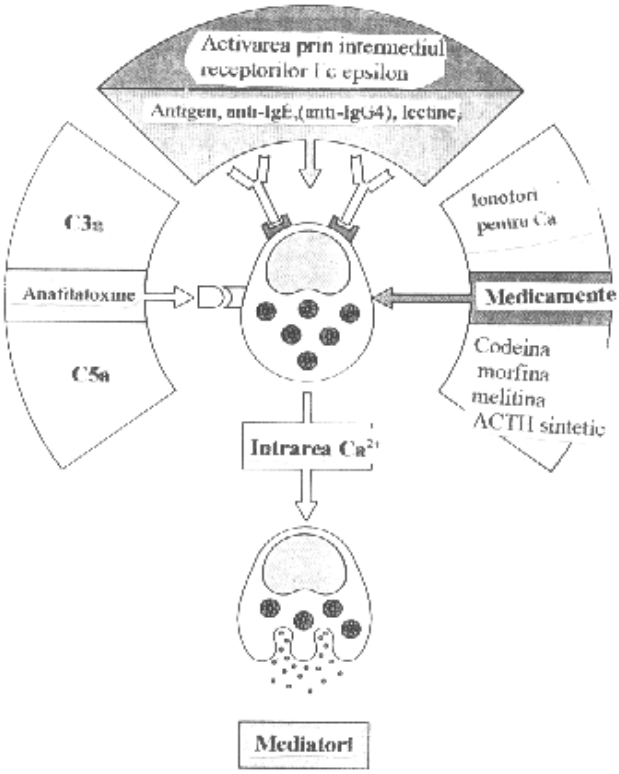


Fig. 117. Alti *stimuli activatori ai mastocitelor*. Anafilatoxinele C3a, C5a sau substantele medica-mentoase (ionoforii de Ca^{2+}, codeina, morfina, ACTH sintetic) activeaza mastocitele pe o cale directa. Toate aceste substante induc patrun-derea Ca^{2+} în mastocit, declansatoare a fenome-nelor biochimice care duc la degranularea si elibe-rarea mediatorilor.

↓

Eliberarea mediatorilor preformati
- histamina
- triptaza - activeaza C_3
- Heparina

Moleculele de IgE pot fi legate încrucisat de *lectine* (PHA, Con A), prin asocierea lor cu resturile glucidice ale regiunii Fc. Astfel se explica

urticaria produsa de capsuni si cirese, care contin cantitati mari de lectine.

Stimulul activator al mastocitelor este transmis prin receptorii pentru IgE. Activarea se datoreaza legarii încrucisate a doua situsuri Fab, printr-o molecula de alergen. Mastocitele au si receptori pentru Fc γ, care leaga IgG cu afinitate mult mai mica. Degranularea mastocitelor este precedata de influxul masiv de Ca^{2+}. Granulele pline cu mediatori preformati, migreaza la periferia celulei, fuzioneaza cu membrana externa si elibereaza continutul: *histamina, proteaze neutre* (triptaza, chimaza, carboxipeptidaza), *proteoglicani* (heparina, condroitin-sulfatul).

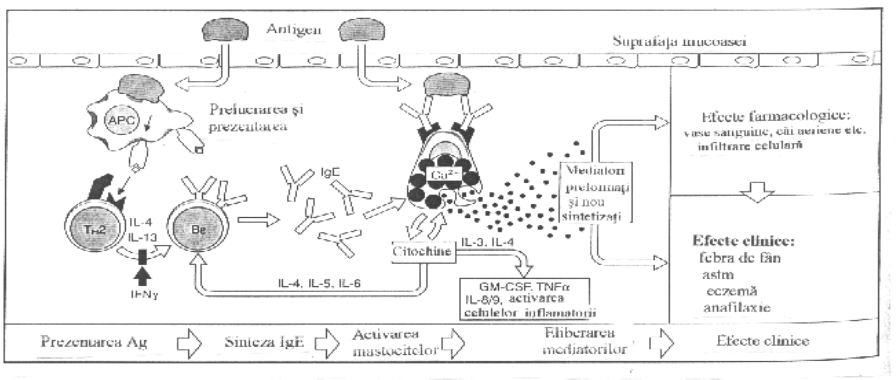


Fig. 118. Inducerea si mecanismele efectoare ale *hipersensibilitatii de tip I*. Prelucrarea antigenului se face la nivelul mucoaselor. Reexpunerea la alergen declanseaza degranularea mastocitelor si producerea mediatorilor ce determina simptome alergice (dupa Mirakian, 1998).

Triptaza (prezenta în mastocite, dar absenta în bazofile) produce constrictia muschilor netezi ai bronhiilor, iar *chimaza* stimuleaza secretia mucoasei bronsice.

Proteoglicanii din granulele mastocitelor au rol în împachetarea mediatorilor preformati în granule.

Heparina este proteoglicanul predominant în mastocitele pulmonare umane. Mastocitul este singura sursa endogena de heparina la om si la rozatoare. Heparina are efect anticoagulant.

Mastocitele contin SOD si peroxidaza.

Degranularea activeaza o *lipaza* care mobilizeaza *acidul arachidonic* din membrana mastocitului. Prin metabolizarea acestuia se sintetizeaza mediatori noi ai reactiei de hipersensibilitate imediata. Astfel, din acidul arachidonic, pe calea lipooxigenazei se sintetizeaza

leucotriene, iar pe calea ciclooxigenazei se formeaza *prostaglandine* si *tromboxan*.

Efectele mediatorilor mastocitari

Manifestarile reactiilor alergice, inclusiv alergia respiratorie, pot sa se produca în doua faze:

– *faza timpurie*, care se desfasoara în câteva minute, datorita eliberarii mediatorilor preformati;

– *faza tardiva* se produce la 3-4 ore dupa expunerea la alergen, datorita infiltratului celular, ca raspuns la mediatorii fazei timpurii.

În prima etapa, actiunea histaminei consta în *contractia muschilor netezi* ai tractului respirator si digestiv. Histamina produce constrictia celulelor endoteliale si creste permeabilitatea vaselor mici. Acelasi efect îl are serotonina. Prin constrictia celulelor endoteliale si cresterea permeabilitatii capilare, se produce *edemul tisular*.

În etapa a II-a, histamina produce *dilatarea* vaselor periferice si rezultatul este scaderea brutala a tensiunii arteriale. }ocul hipotensiv este una din manifestarile dramatice ale anafilaxiei generalizate.

Alti mediatori ai fazei a II-a sunt *chininele*. Ele se formeaza din chininogenul plasmatic si sunt polipeptide mici:

– *metionil-chinina* (Met-Lys-Arg-$(Pro)_2$-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

– *bradichinina*(Arg-$(Pro)_2$-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

– *calidina* (lisil-bradichinina): Lys-Arg-$(Pro)_2$-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Chininogenul este alcatuit din 11 aminoacizi si (acid sialic)n, la una sau la ambele extremitati. Este o α-globulina (2 mg/ml ser).

Chininele au efect *vasodilatator* si maresc permeabilitatea capilara, producând edem.

În faza a III-a se sintetizeaza alti mediatori, care întretin în timp diferitele efecte initiate de mediatorii eliberati din mastocite, prin efectul *chimiotactic* fata de celulele sanguine:

ECF (eozinofil-chemotactic factor) determina afluxul de eozinofile

NCF (neutrofil-chemotactic factor)

PAF (factorul activator al plachetelor).

Leucotrienele (LC_4, LD_4, LB_4, LE_4) determina contractia de durata a muschilor netezi, edem al mucoaselor si stimularea secretiei lor.

Exemple de reactii de hipersensibilitate de tip I

Prima reactie de hipersensibilitate imediata a fost descrisa de Prausnitz si Kustner.

Reactiile de hipersensibilitate imediata pot sa se produca la orice organism al unei specii si se numesc *reactii anafilactice* sau se manifesta numai la anumiti indivizi predispusi genetic si se numesc *atopii* (stari atopice).

Reactiile anafilactice (ana = opus; *phylaxis* = protectie) se caracterizeaza printr-o dinamica exploziva a manifestarilor, în decurs de 3-4 minute. Clinic, termenul de anafilaxie semnifica sindromul care rezulta din eliberarea unor mediatori preformati si generati *de novo* în mastocite, care determina o stare opusa celei de protectie. Manifestarile clinice ale reactiilor de hipersensibilitate sunt dependente de calea de patrundere a alergenului si de cantitatea de histamina eliberata. Reactiile cutanate medii, cu eritem, urticarie, prurit, dureri de cap, sunt asociate cu un nivel scazut al histaminei plasmatice (sub 1 ng/ml).

Daca alergenul este injectat *intravenos*, raspunsul este *sistemic*, adica are loc o *anafilaxie generalizata*, care poate duce la *soc vascular hipotensiv* si asfixie secundara prin constrictie bronsica si laringiana. Daca sfârsitul nu este letal, recuperarea functionala se poate face într-o ora. }ocul vascular se datoreaza iesirii plasmei în spatiul extravascular, rezultând scaderea volumului sanguin. Scaderea debitului cardiac duce la hipoxie si acidifierea mediului intern, antrenând si insuficienta respiratorie.

Daca alergenul este injectat în *piele*, reactia este limitata la locul injectiei si se numeste *anafilaxie cutanata*, însotita de eritem (urticarie), angioedem, edem laringian, bronhoconstrictie, hipotensiune, aritmie cardiaca.

Anafilaxia generalizata (sistemica) este forma cea mai grava a hipersensibilitatii imediate. Mult timp s-a considerat ca anafilaxia generalizata este o manifestare patologica, indusa numai în conditii experimentale la animalele de laborator. In realitate, atât la om cât si la animale se produc ambele tipuri de reactii anafilactice, atât *generalizate*, cât si *locale*.

Prima reactie de *anafilaxie generalizata* a fost descrisa la câine. În 1902, Richét si Portier studiau biologia meduzelor si toxicitatea extractelor apoase si glicerinate din celenterate, asupra mamiferelor. Administrate în doze mari, extractele produc moartea imediata a câinelui, datorita socului toxic, dar dozele mici sunt suportate. O injectie secundara la câteva saptamâni mai târziu, produce o *reactie anafilactica generalizata*, cu paralizia muschilor respiratori si socul fatal. Instalarea starii de soc este accelerata de injectarea intravenoasa a dozei secundare. La autopsie se observa edemul mucoasei intestinale, a tesutului pulmonar, congestia ficatului.

La cobai, anafilaxia se induce prin injectarea intravenoasa a unei

doze mici (1mg) de albumina serica bovina. La 8 zile dupa injectarea *dozei sensibilizante*, animalul devine sensibil la socul anafilactic si are sensibilitate maxima la 21 de zile. Doza *declansatoare* a socului este mai mare. Raspunsul anafilactic este prompt si manifestarile încep în primele zeci de secunde: piloerectie dorsala, agitatie motorie, stranut, tuse zgomotoasa, cianozarea mucoaselor, pierderea reflexelor de mictiune si defecatie, blocaj respirator, convulsie, moarte. Tabloul acestor modificari patologice se succede în câteva minute. Muschii netezi bronsici ai cobaiului sunt foarte sensibili la histamina si bronhoconstrictia fatala este caracteristica anafilaxiei la aceasta specie.

Reactiile anafilactice generalizate la om se manifesta în primul rând fata de alimente si se exteriorizeaza prin *urticarie generalizata*. Urticaria afecteaza 15-23% din populatie Suportul manifestarilor patologice care însotesc aceste reactii, este *tegumentul*.

Anafilaxia generalizata la om, este declansata si de alti factori: penicilina, aloseruri, heteroseruri, veninul insectelor (albina, viespe) si se manifesta prin urticarie generalizata, spasmul muschilor bronsici, edem laringian, dispnee severa, cianoza, soc hipotensiv. Intensitatea manifestarilor este dependenta de gradul de sensibilitate. Sensibilitatea alergica a pacientilor variaza în limita a circa 1/1000.

Raspunsul sistemic cu reactii tegumentare generalizate, tulburari gastrointestinale, tahicardie, aritmie cardiaca, hipotensiune medie, este asociat cu cresterea concentratiei plasmatice a histaminei peste nivelul de baza. Reactia ampla care pericliteaza viata, cu hipotensiune severa, fibrilatie ventriculara, spasmul muschilor bronsici, stop cardiac si respirator, este asociata cu nivelul crescut al histaminei, de 12 ng/ml. La om, histamina are efect vasodilatator asupra vaselor periferice, cu scaderea presiunii vasculare.

Hipersensibilitatea imediata la *penicilina* produce circa 500 decese/an/glob. Reactia este declansata de penicilina nativa sau de derivatii rezultati din degradarea ei (acidul peniciloic, acidul penicilenic).

Anticorpii anti-penicilina apartin izotipurilor IgE si IgG_4 si se gasesc chiar în serul persoanelor netratate cu penicilina. Probabil ca sinteza lor a fost indusa de penicilina din carne. Originea penicilinei este în masa miceliana de la fabricile de antibiotice, care se adauga în hrana animalelor, ca stimulator al cresterii.

Alergenele *inhalate* produc manifestari locale, la poarta de intrare.

Reactii atopice. Termenul de *atopie* defineste starile de hipersensibilitate imediata cu substrat ereditar, limitate la om. Starile atopice se manifesta la 10-20% din populatie, sub forme variate.

Reactiile atopice au un tablou clinic mai simplu si se produc atunci

când reactia alergenului cu anticorpii specifici are loc pe suprafata unei mucoase sau în epiteliul tegumentar.

Rinita alergica sau *febra de fân* este forma cea mai simpla a atopiei si se manifesta prin secretie abundenta a glandelor epiteliului nazal, iar *astmul bronsic*, prin contractia muschilor cailor respiratorii. Cele doua forme extreme de manifestari alergice sunt determinate de alergenele inhalate, care se gasesc în polen, în praful de casa(ce contine alergene de acarieni), în parul animalelor. Foarte raspândite sunt alergiile la polenul de *Ambrozia*, o planta care raspândeste o cantitate mare de polen (100 kg/planta/an). Grauncioarele de polen vin în contact cu mucoasa nazala si respiratorie, cu conjunctiva oculara si determina o stare de sensibilizare a aparatului respirator. Reexpunerea la polen în sezonul urmator, declanseaza reactia alergica, cu urmatoarele manifestari: eritemul conjunctivei oculare, edemul mucoasei nazale si secretia apoasa abundenta, stranut.

Intensitatea simptomelor depinde de nivelul cantitativ al expunerii la polen, dar si de reactivitatea organismului. Exista situatii grave, inexplicabile, cu crize ample, dupa o expunere minimala.

Daca rinita are caracter sezonier sau este dependenta de conditiile de mediu, aproape sigur are caracter alergic. Rinita alergica perena se datoreaza contactului cu praful de casa si de animale.

Mecanismul rinitei alergice este diferit de al altor manifestari alergice. In primul rând, exista diferente functionale între mastocitele mucoaselor si ale tesutului conjunctiv. Mastocitele mucoasei nazale(denumite MC_T) contin histamina si *triptaza,* iar dupa stimularea alergenica, se degranuleaza, dar concentratia plasmatica a histaminei nu se modifica. Mediatorii mastocitari produc o hiperemie a mucoasei nazale, edem si transudarea lichida. Inflamatia nazala se datoreaza transudarii, în care *albumina* este un marker mult mai stabil decât mediatorii din categoria citochinelor.

În al II-lea rând, manifestarile rinitei sunt dependente de particularitatile unice ale vascularizatiei nazale, conferite de *tesutul venos erectil*. Variatiile volumului sanguin din tesutul venos erectil regleaza rezistenta tractului nazal la coloana de aer. Umplerea cu sânge a acestui tesut produce congestia mucoasei. Curgerea sângelui este controlata de fibrele nervoase vegetative. Inervatia simpatica este vasoconstrictoare si diminua fluxul sanguin, iar tonusul simpatic are activitate ciclica. De aceea, mucoasa nazala are o perioada de repaus la fiecare 2-4 ore, iar caile nazale se pot obtura alternativ.

Faza primara a rinitei (stranut, rinoree, obstructie nazala) este

dependenta de histamina din mastocite, de leucotriene si prostaglandine, iar faza tardiva (obstructie nazala ampla prin hiperreactivitate si anosmie) este dependenta de bazofile.

Astmul alergic, o varianta complexa a reactiilor atopice, este o maladie cronica inflamatorie a plamânului, cu o prevalenta crescânda a morbiditatii si mortalitatii în ultimele doua decenii. Desi s-a considerat ca este o boala a muschilor netezi ai cailor respiratorii, în ultima decada s-a acceptat ca astmul este, în primul rând, o boala *inflamatorie*. Structural, caile aeriene ale astmaticilor se caracterizeaza prin *inflamatie cronica*, cu infiltrarea intensa a mucoasei bronsice, cu limfocite, eozinofile si mastocite, cu descuamarea epiteliului, hiperplazia celulelor mucoase, îngrosarea submucoasei. Aceste modificari se asociaza cu manifestarile clinice, care includ obstructia cailor aeriene si hiperreactivitatea cailor aeriene.

Astmul bronsic alergic are determinism multifactorial, *atopia* (predispozitia genetica de a sintetiza IgE ca raspuns la aeroalergenele comune) fiind cel mai comun factor predispozant. Dupa expuneri repetate la doze mici de alergene, indivizii atopici sintetizeaza IgE. Expunerea secundara la alergene initiaza raspunsul imun humoral. Evenimentele reactiei alergice, consecutive expunerii la alergen, se desfasoara în doua faze: faza *timpurie*, de ordinul minutelor, consta în *raspunsul bronhospastic* si faza *tardiva*, de ordinul orelor, ce consta în *raspunsul inflamator*.

Raspunsul rapid se caracterizeaza prin *edemul* mucoasei, *cresterea tonusului muschilor netezi* si îngustarea cailor respiratorii, asociata cu degranularea mastocitelor. Manifestarile astmatice imediate sunt dependente de eliberarea histaminei din mastocite. Pacientii cu astm alergic au o concentratie de IgE de 6 ori mai mare decât astmaticii nealergici, ceea ce confirma relatia dintre concentratia IgE si starea patologica.

Unii astmatici alergici dezvolta raspunsul de *faza tardiva*, la 3-6 ore dupa stimularea cu alergenul, care, în absenta terapiei, poate sa persiste câteva zile. Raspunsul tardiv, este asociat cu migrarea eozinofilelor, dar si a neutrofilelor si limfocitelor din sânge, în parenchimul pulmonar. Limfocitele TCD_4 au rol esential în patogeneza astmului. In plamânul astmatic, alergenul este înglobat, prelucrat si prezentat de macrofagul alveolar, de celulele epiteliale ale mucoasei si de celulele dendritice. Limfocitele Th-2 secreta IL-4, 5, 6, 9, 10, 13, stimulatoare ale sintezei de IgE.

Alergiile la alimente formeaza o categorie de stari atopice foarte

comune la copii si se manifesta fata de alergene din lapte, oua, ulei de peste, ciocolata, capsuni, cirese, portocale. Manifestarile reactiilor alergice la alimente pot fi *locale* sau *generalizate*.

Reactiile alergice locale se caracterizeaza prin eruptii urticariene (pustule eritematoase) la nivelul mucoasei bucale, însotite uneori de tulburari digestive (colici abdominale, diaree). La vârsta adulta, subiectii vor manifesta reactii alergice respiratorii.

Nu toate urticariile tegumentare sunt determinate de reactii alergice. Urticaria *neimuna* de contact poate fi declansata de *agenti chimici* (salicilati, sulfiti, acidul benzoic, acidul sorbic, acidul nicotinic si esterii sai din alimente, din guma de mestecat, din sampoane, din parfum, din unguente) sau de *agenti fizici* (traumatisme, frigul). Acestia stimuleaza eliberarea factorilor chimici inductori ai urticariei. Mecanismele ei nu se cunosc, dar efectele se manifesta asupra endoteliului vascular. Simptomele sunt arsura, usturimea, pruritul, edemul si eritemul.

Urticaria este *acuta* sau *cronica*. Cea cronica se manifesta prin aparitia zilnica sau aproape zilnica a leziunilor tegumentare, pentru un interval de cel putin 6 saptamâni, cauzata de stimuli fizici.

În toate cazurile de urticarie, imuna sau neimuna, pe tegument apar leziuni eritematoase (macule) si edematoase, însotite de prurit. Urticaria implica dermul superficial.

Leziunea cutanata eruptiva este datorata cresterii permeabilitatii capilarelor si dilatarii venulelor. Plasma paraseste patul vascular si determina formarea pustulei tegumentare pruriginoase, înconjurata de o zona de culoare rosie intensa. Lichidul veziculelor eruptive este infiltrat cu limfocite si PMNN. Eruptia tegumentara dispare la 24-48 ore, fara urme în cazul reactiilor acute sau persista mai multe zile la cele cronice.

În manifestarile cu angioedem, edemul se extinde subcutan sau submucos si leziunile pustulare sunt mai mari si pot sa dureze 72 de ore. Se manifesta la nivelul buzelor, limbii, pleoapelor, dar poate fi afectata orice zona corporala.

Pseudoalergii. Simptomele clinice ale alergiilor (urticarie, rinita, astm, socul anafilactic) apar adeseori din cauze nealergice. Numarul lor depaseste pe acela al alergiilor. Iata principalele cauze:

– histamina se gaseste în cantitati mari în unele alimente si activeaza mediatorii specifici ai reactiilor alergice;

– histidina din alimente este precursorul histaminei;

– tiramina de origine alimentara determina dureri de cap pulsatile si hipertensiune;

– feniletilamina produce migrena;

– benzoatul de origine alimentara si din acidul benzoic produce

astm si rinita;

– bisulfitul de sodiu, bioxidul de sulf si metabisulfitii (conservanti) produc simptome ale tractului gastrointestinal, distrug vitaminele B, produc dureri de cap, astm;

– glutamatul monosodic (agent de aromatizare) produce astm;

– colorantii alimentari (în special culoarea galbena) produc astm si alte reactii alergice;

– aspirina induce astm, urticarie, angioedem (Girard, 1998).

Testarea starilor atopice

Pentru prevenirea accidentelor provocate de reactiile de hipersensibilitate imediata, în clinica, înainte de administrarea unor medicamente, se testeaza eventualele manifestari de hipersensibilitate.

O problema esentiala pentru diagnosticul si tratamentul alergiilor, este gradul înalt de variabilitate biochimica a alergenelor, de la un lot la altul. Preparatele de alergene sunt foarte heterogene, iar cantitatea de alergen specific, din cele mai multe extracte comerciale, variaza de la câteva procente pâna la 50% din proteina totala. Extractele sunt amestecuri complexe, cu cantitati variabile de alergene majore, alergene minore si proteine irelevante. Extractele fungice contin proteine, glucide, enzime proteolitice, enzime glicolitice, în cantitati variabile. De aceea, efortul major s-a orientat în directia *clonarii alergenelor* de importanta clinica majora. Majoritatea alergenelor s-a clonat si unele sunt disponibile la un nivel moderat sau chiar înalt de puritate. Disponibilitatea preparatelor antigenice omogene, cu puritate si activitate biologica definite, va avea un impact major asupra diagnosticului si probabil, asupra terapiei dezordinilor alergice.

Multe alergene, în special cele de natura proteica, se prezinta într-o multitudine de izoforme naturale. Ele sunt rezultatul variatiei alelice a numeroaselor proteine vegetale si fungice, foarte asemanatoare ca secventa a aminoacizilor, dar au proprietati distincte de combinare cu anticorpii sau de activare a clonelor de limfocite T specifice.

Existenta numeroaselor izoforme ale aceleiasi molecule de alergen, este probabil, asociata cu grade diferite de recunoastere a epitopilor sai, de catre limfocitelor T si B si, ca o consecinta, cu grade diferite de sensibilitate. Ca dovada, anticorpii de la diferiti pacienti alergici, leaga numai unele izoforme ale alergenului.

Preparatele de alergene pentru diagnostic sunt heterogene si deriva din surse naturale care contin majoritatea sau toate izoformele de alergen. Inlocuirea acestor alergene cu cele clonate, pentru diagnostic,

va rezolva unele probleme, dar va crea altele. Unii cercetatori apreciaza ca majoritatea indivizilor raspund la un numar limitat de epitopi ai oricarui alergen. De aceea se considera ca un numar mic de alergene (circa 40) ar putea sa fie suficiente pentru a identifica majoritatea indivizilor alergici.

Testele cutanate constau în injectarea subcutana a *alergenelor* la diferite dilutii. La organismul alergic, reactia de hipersensibilitate se manifesta în câteva minute, prin aparitia la locul injectarii, a unei reactii inflamatorii pruriginoase, înconjurata de o zona mai extinsa de eritem. Reactia de hipersensibilitate la proteinele salivei de tântar are acelasi aspect. Alergenul injectat (sau inoculat) se leaga specific de IgE fixat pe mastocitele din piele. Mastocitele elibereaza histamina în câteva minute, cauzând edemul localizat, eritem (vasodilatatie) si prurit. Leziunile locale ale reactiei de hipersensibilitate imediata se reproduc prin injectarea unei cantitati mici de histamina.

Determinarea cantitativa a IgE seric al pacientului, ramâne cel mai bun criteriu de diagnostic. IgE se dozeaza prin metoda RIA:

– alergenul (de exemplu, penicilina) se fixeaza pe suportul inert (dextran);

– proba de ser de cercetat se pune în contact cu alergenul fixat pe suport. IgE din ser se fixeaza pe alergenul imobilizat;

– se adauga ser imun de iepure, care contine IgG marcat radioactiv, anti-IgE uman;

– se masoara indirect cantitatea de IgE fixata pe suport, prin masurarea cantitatii de IgG radioactiv legat specific.

Combaterea starilor de hipersensibilitate imediata de tip I se face prin evitarea alergenelor, prin terapie medicamentoasa si prin imunoterapie.

Masurile de *evitare a alergenelor* sunt ideale pentru prevenirea reactiilor: evitarea alimentelor, medicamentelor, controlul prafului de casa, evitarea contactului cu animalele al caror praf este alergic, combaterea mucegaiului din încaperile locuite.

Medicamentele antihistaminice au efect antagonic fata de histamina, deoarece intra în competitie cu receptorii pentru histamina ai celulelor tinta. Astfel, se poate bloca cresterea permeabilitatii vasculare, vasodilatatia, contractia muschilor bronhiilor si ai mucoasei gastrointestinale. Rinita alergica necesita terapie antihistaminica locala. Cromoglicatul de sodiu protejeaza pacientii astmatici. Teofilina(o metilxantina) relaxeaza muschii netezi bronsici.

Imunoterapia sau hiposensibilizarea consta în administrarea planificata a alergenului la un pacient pentru a diminua sinteza IgE. Rinita alergica, astmul bronsic si anafilaxia la veninul de insecte pot raspunde la aceasta terapie. Alergenul este injectat saptamânal, în doze

declinul. Locul IgE este luat de IgG care fixeaza alergenul si-l împiedica sa stimuleze mastocitele, blocând reactia alergica.

Reactiile de hipersensibilitate de tip II

Reactiile de hipersensibilitate de tip II sunt de tip *citotoxic*, dependente de anticorpi si sunt consecinta actiunii *fagocitelor* asupra celulelor nucleate, dupa opsonizarea lor prealabila cu anticorpi sau cu componente ale complementului.

Diferitele izotipuri de anticorpi variaza în ceea ce priveste posibilitatea lor de a initia aceste reactii, în functie de capacitatea de a lega C1q sau de a interactiona cu receptorii pentru regiunea Fc, ai celulelor efectoare. Mediatorii reactiilor de hipersensibilitate de tip II sunt IgG, IgM, si componentele complementului (C3), care se leaga specific de antigenele celulare sau tisulare.

Consecinta legarii anticorpilor, este aparitia leziunilor, limitate la celulele sau tesuturile care expun antigenele. In general, anticorpii specifici fata de antigenele suprafetei celulelor proprii, produc efecte defavorabile iar cei specifici fata de antigenele intracelulare sunt inofensivi.

În reactiile de hipersensibilitate imediata de tip citotoxic, anticorpii specifici fata de antigenele suprafetei celulare coopereaza cu componentele complementului si cu celulele efectoare.

Celulele efectoare sunt macrofagele, neutrofilele, eozinofilele, celulele NK. Toate au receptori pentru regiunea Fc a Ig si receptori pentru C3. Legarea anticorpilor prin intermediul receptorului pentru Fc, stimuleaza fagocitele sa produca leucotriene si prostaglandine, implicate în raspunsul inflamator.

Mecanismul prin care celulele efectoare ataca celulele tinta este acelasi prin care ele sunt active fata de agentii infectiosi. Agentii patogeni sunt înglobati în fagolizosom, unde, de cele mai multe ori, virusurile sunt inactivate iar celulele sunt omorâte sub actiunea intermediarilor reducerii O_2, a enzimelor lizosomale, a pH acid.

În reactia de hpersensibilitate imediata de tip citotoxic, tinta celulara este prea mare pentru a fi fagocitata si de aceea, continutul granulatiilor si al lizosomilor citoplasmatici este eliberat la contactul cu celula sensibilizata, prin *exocitoza.*

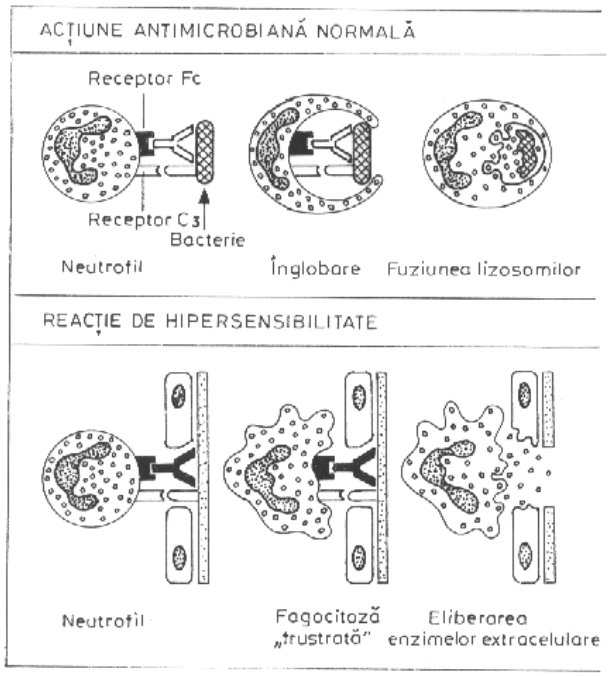


Fig. 120. Fagocitoza “frusta” are rol în pro-ducerea leziunilor tisu-lare, în reactia de hiper-sensibilitate imediata de tip II (jos) si este pre-zentata comparativ cu functia fagocitara nor-mala a neutrofilelor (sus).

Exocitoza continutului enzimatic al fagocitelor are efect benefic, daca tinta este un parazit, dar este defavorabila daca tinta este tesutul propriu, care a fost sensibilizat în prealabil de anticorpi.

Alti efectori ai hipersensibilitatii citotoxice mediata de anticorpi, sunt *celulele K*. Ele au receptori de mare afinitate pentru regiunea Fc si produc efecte citotoxice.

Declansatorii reactiilor de hipersenbilitate imediata de tip citotoxic sunt *aloantigenele*.

Reactiile citotoxice dependente de anticorpi *sunt* consecutive *aloimunizarii*, adica au loc dupa contactul cu antigenele unui organism al aceleiasi specii, dar cu o alta varianta alelica a moleculelor CMH.

Aloimunizarea survine în urmatoarele situatii:

- *transfuzii de sânge izogrup*
- *aloimunizarea feto-materna în cazurile de incompatibilitate Rh*
- *în transplantul de tesuturi si organe.*

Aloimunizarea post-transfuzionala

Într-o transfuzie heterogrup, incompatibila în sistemul ABO, reactia de aglutinare este imediata, deoarece receptorul poseda *aglutinine preformate* fata de hematiile transfuzate. Aglutininele α si β apartin clasei IgM. Ele produc aglutinarea rapida, activarea cascadei complementului si hemoliza intravasculara.

Transfuzia izogrup produce *aloimunizarea*, deoarece în interiorul aceluiasi grup eritrocitar din sistemul ABO, exista diferente antigenice mai fine ale glicoproteinelor suprafetei eritrocitare, care induc sinteza IgG în organismul receptor. Circa 8% dintre receptorii politransfuzati se imunizeaza fata de antigenele eritrocitare de izogrup sanguin si circa 25% se imunizeaza fata de antigenul HLA al leucocitelor. Se sintetizeaza anticorpi ai izotipului IgG. IgG declanseaza mecanismele hipersensibilitatii de tip citotoxic si eritrocitele transfuzate sunt lizate.

Reactiile post-transfuzionale izogrup se manifesta, uneori, chiar imediat dupa prima transfuzie, deoarece sunt mediate de anticorpi preexistenti, care s-au sintetizat fata de antigenele bacteriene ce dau reactie încrucisata cu antigenele eritrocitare. Alteori, reactiile de hipersensibilitate se manifesta la câteva zile sau chiar saptamâni dupa transfuzie, interval necesar sintezei anticorpilor. Reactiile de hemoliza produc icter* si anemie. Icterul se datoreaza hemolizei masive, care poate produce necroza acuta a tubilor renali, sub actiunea hemoglobinei.

Reactiile post-transfuzionale orientate fata de antigenele plachetare si leucocitare, au consecinte mai putin grave.

Aloimunizarea fetomaterna în incompatibilitatea Rh *

În timpul sarcinii, dar în special în timpul expulziei fatului, hematiile fetale pot traversa placenta si intra în circulatia materna. In cazul incompatibilitatii Rh(mama Rh^- si fatul Rh^+, de origine paterna), organismul matern se imunizeaza cu antigenul Rh al hematiilor fatului si se sintetizeaza anticorpi. S-au detectat doua clase de anticorpi: IgM, care determina aglutinarea eritrocitelor Rh^+; IgG, fara efect aglutinant. Din punct de vedere clinic, IgG anti D are o importanta mai mare, deoarece traverseaza placenta.

Antigenul Rh este o glicoproteina, ancorata în stratul lipidic membranar. Imunizarea materna cu antigenul Rh se produce atât în timpul sarcinii, dar mai ales la nastere, când eritrocitele fetale, prin ruperea vaselor trec în circulatia materna. IgG traverseaza placenta si

se fixeaza pe eritrocitele fetale, cauzând distrugerea lor prin mecanismul hipersensibilitatii de tip citotoxic, adica anticorpii fata de componentele celulare stimuleaza fagocitoza hematiilor prin aderenta opsonica sau distrugerea are loc prin activarea complementului si hemoliza. Consecinta este anemia, icterul, edemul. Situatia patologica se poate preveni prin administrarea organismului matern, imediat dupa nastere, a gama-globulinei anti-Rh (anti-D), care elimina celulele fetale Rh^+ intrate în circulatia materna si protejeaza urmatoarea sarcina Rh^+.

Imunizarea Rh este mult mai putin frecventa decât incompatibilitatea materno-fetala Rh, din urmatoarele cauze: transferul placentar al hematiilor fetale poate sa nu aiba loc; 30% dintre femeile Rh^- nu raspund la stimularea cu o cantitate mica de hematii Rh^+, iar un procent mic nu raspunde nici dupa stimulare cu 50 ml de hematii Rh^+; fatul poate fi incompatibil cu organismul matern în sistemul ABO. De exemplu, pentru mama cu grup O si fatul cu grup A sau B, hemaglutininele materne α si β (IgM) elimina celulele fetale înainte ca ele sa stimuleze sinteza anticorpilor anti Rh.

Anticorpii anti D se pot detecta folosind Ig de iepure anti-Ig umana, care leaga încrucisat IgG anti-D, în prezenta unui amestec de ser, cu albumina serica bovina, care reduce sarcina suprafetei eritrocitelor, usurând aglutinarea.

Un primitor de sânge Rh^- poate sintetiza anticorpi anti-D, daca este transfuzat cu sânge RhD^u. O gravida RhD^u se poate imuniza anti-D, daca eritrocitele fetale sunt Rh^+ cu antigen complet. De aceea, orice gravida, Rh^+D^u este considerata Rh^- si este testata pentru prezenta anticorpilor anti-Rh.

În transfuzie, persoanele Rh^+D^u se considera ca fiind Rh^-, în cazul în care sunt receptoare si Rh^+, daca sunt donoare de sânge.

Anemia hemolitica indusa de medicamente(imunoalergica).

Unele reactii imunitare fata de celulele sanguine (eritrocite, plachete) se pot manifesta ca o consecinta a uzului de medicamente. Reactia este orientata fata de molecula nativa sau fata de un derivat rezultat din degradarea sa. Astfel de reactii imunoalergice sunt produse de penicilina, quinina, sulfamide etc.

Anemiile hemolitice imunoalergice se datoreaza modificarii specificitatii antigenice a unor molecule ale suprafetei eritrocitare, sub actiunea unor medicamente care actioneaza ca haptene. Pentru ca un medicament sa fie imunogenic, este necesar ca molecula nativa sau un metabolit al sau, sa se cupleze cu o molecula proteica *in vivo*. Antibioticele β-lactamice sunt un exemplu de molecule cu proprietati de

haptene. Ele formeaza legaturi covalente cu proteinele, datorita ruperii spontane a inelului β-lactamic si datorita producerii spontane a gruparii peniciloil cu reactivitate chimica crescuta. La doze mari de antibiotic, moleculele proteice ale organismului sunt modificate, dupa legarea moleculelor β-lactamice. Conjugatul antibiotic-proteina este inductor al sintezei IgM si IgG si rezultatul este *hemoliza*.

Alte medicamente care genereaza reactii imunitare, în absenta sintezei anticorpilor sunt sulfonamidele. Ele produc metaboliti care se leaga preferential cu anumite proteine. Grupul enzimelor cu citocrom P_{450} este tinta legarii metabolitilor sulfonamidei. Proteina alterata genereaza un peptid care se asociaza cu complexul CMH al celulei, devenind tinta atacului limfocitelor T.

Mecanismele moleculare ale inducerii reactiilor hemolitice imonoalergice sunt ipotetice. Reactia autoimuna se datoreaza modificarii specificitatii antigenice a unor molecule ale suprafetei eritrocitare, sub actiunea unor medicamente care dupa ce se adsorb pe suprafata hematiei, actioneaza ca haptene, fie în stare nativa, fie dupa generarea unui intermediar reactiv. Se formeaza *conjugate haptena-proteine* eritrocitare, în care haptena are rol de epitop stimulator al raspunsului imun. Alteori, molecula legata necovalent, actioneaza prin modificarea conformatiei native a proteinei. Noul epitop stimuleaza limfocitele TCD_4, care activeaza limfocitele B. Se sintetizeaza anticorpi cu specificitate foarte larga: anticorpi anti-haptena care se leaga cu conjugatul, anticorpi care reactioneaza cu proteinele membranare în absenta haptenei. Dupa fixarea complementului se produce hemoliza.

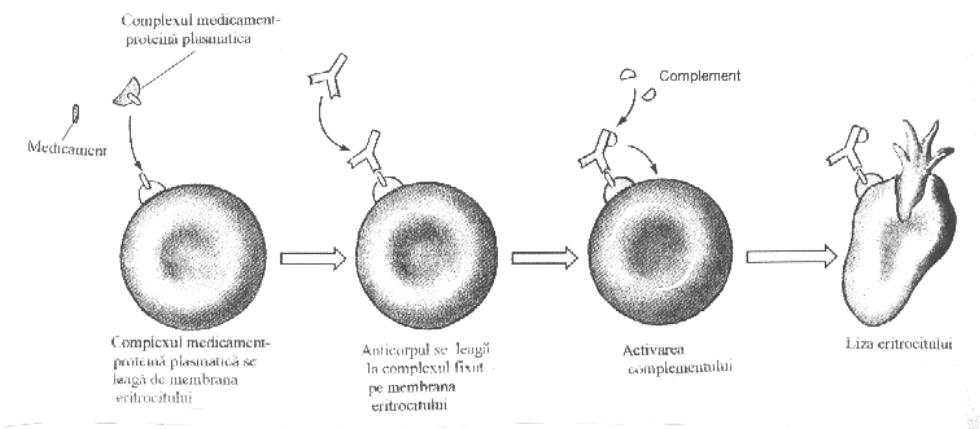


Fig. 121. *Reactia de hipersensibilitate de tip II*, indusa de medicamente. Molecula nativa

sau un produs al metabolismului sau, se poate lega de membrana eritrocitara sau de o proteina plasmatica pentru a forma un complex care se leaga de membrana eritrocitara sau altereaza proteina membranara. Se sintetizeaza auto-anticorpi – IgG sau IgM – care se fixeaza pe complex si activeaza complementul, producând liza eritrocitului.

Medicamentele se pot complexa cu proteine plasmatice si formeaza conjugate haptena-proteine, inductoare ale sintetzei anticorpilor specifici. Se formeaza complexe imune, care se adsorb pe hematii si ulterior se produce liza.

Un anumit medicament poate produce o varietate de fenomene patologice, la diferiti pacienti: hemoliza, trombocitopenia, neutropenia sau combinatii ale acestor fenomene.

Anemia hemolitica indusa de medicamente este divizata în 4 grupe patofiziologice majore:

– *hemoliza de tip haptenic* apare la pacientii expusi la doze mari de penicilina (10-20 milioane de unitati/zi). Moleculele de penicilina sau derivatii sai activi se cupleaza cu glicoproteinele suprafatei eritrocitului si au rolul de haptena. Conjugatele stimuleaza raspunsul imun cu sinteza de IgG. Diagnosticul se poate stabili prin incubarea serului pacientului cu eritrocitele de la un donor normal, preincubate cu penicilina. IgG se fixeaza pe suprafata eritrocitelor tapetate cu penicilina si se detecteaza prin *testul antiglobulinic* (testul Coombs direct). Acelasi tip de hemoliza este indus de cefalosporine;

– *hemoliza de tip quinidinic*. Quinidina sau derivatii sai se fixeaza pe proteine plasmatice sau de membrana eritocitara si au rolul de haptene. Se sintetizeaza IgM antiquinidina, se activeaza calea clasica a complementului si C3 se depune pe suprafata eritrocitului;

– *hemoliza indusa de* α*-metildopa*. O proportie mare (25%) dintre pacientii tratati cu α-metildopa devin pozitivi pentru testul Coombs. Se sintetizeaza IgG specific fata de antigenul Rh. Hemoliza survine la mai putin de 1% dintre pacientii tratati cu α-metildopa;

– *hemoliza indusa de cefalotina* este rara. Antibioticul se fixeaza pe membrana eritrocitului si astfel celula se tapeteaza cu diferite proteine plasmatice. Se sintetizeaza IgG si testul antiglobulinic este pozitiv.

Majoritatea pacientilor cu anemie imunolaergica au un titru scazut al IgG si hemoliza are un nivel scazut. Tratamentul cu glucocorticoizi are efecte benefice, deoarece diminua sinteza de IgG, determina elutia IgG de pe suprafata eritrocitelor si interfera cu receptorii macrofagelor pentru Fc γ, ceea ce prelungeste perioada de supravietuire a eritrocitelor.

Respingerea acuta a grefelor de tesuturi si organe, ca o

consecinta a citotoxicitatii, va fi discutata ulterior.

Reactiile citotoxice mediate de anticorpi specifici fata de antigenele tisulare sunt consecutive *maladiilor autoimune*.

Unele maladii autoimune sunt însotite de sinteza anticorpilor anti-membrana bazala. Regiunea Fc a anticorpilor fixati, este recunoscuta de PMNN, care îsi revarsa continutul enzimatic si produc leziuni tisulare. Actiunea PMNN este frusta, deoarece ele nu pot fagocita o tinta tisulara de dimensiuni mari.

Reactiile de hipersensibilitate imediata de tip III

Hipersensibilitatea imediata de tip III este dependenta de *complexele imune* si este consecinta formarii si *persistentei complexelor imune* în organism.

In vivo, complexele imune se formeaza de fiecare data când anticorpii întâlnesc antigenul specific. De obicei, complexele imune sunt epurate (eliminate din circulatie) de celulele SFM, iar persistenta lor produce manifestari patologice (reactii de hipersensibilitate).

Complexele imune *in vivo* se formeaza în urmatoarele trei situatii:

– în *infectiile cronice* cu streptococ α-hemolitic, cu stafilococ, cu *Plasmodium*, cu virusurile hepatitice B si C, cu HIV. In toate aceste cazuri, antigenele persista timp îndelungat. Se sintetizeaza anticorpi specifici si se formeaza complexe imune, care eventual se depun în tesuturi;

– complexele imune pot fi rezultatul *proceselor patologice autoimune*. Sinteza continua a anticorpilor fata de componentele self modificate, determina formarea complexelor imune, care nu pot fi eliminate în ritmul formarii si se depun;

– complexele imune se pot forma cu *antigenele exogene*, care nu se multiplica în organism, dar patrund în mod repetat, în cantitate mare. Astfel, antigenele vegetale, bacteriene (din actinomicete), fungice sau antigene de origine animala, dupa inhalarea repetata în plamân, induc sinteza locala a anticorpilor si formarea complexelor imune.

Complexele imune interactioneaza cu celulele sistemului imunitar (macrofage, limfocite), producând activarea sau inactivarea lor. Un alt efect major este stimularea retelei citochinelor. Proteinele plasmatice C1q, C4b, C3b, factorul H sau anticorpii anti-IgG(factorul reumatoid), anticorpii anti-idiotipici si anti-fibronectina maresc dimensiunile complexelor imune.

Complexele imune sunt structuri tridimensionale ce formeaza o

retea moleculara alcatuita din antigen si anticorpii specifici, ale carei dimensiuni variaza în functie de dimensiunile antigenului, de densitatea epitopilor imunogenici, de izotipul anticorpilor, de multi- sau monospecificitatea anticorpilor, de afinitatea lor.

Pentru demonstrarea complexelor imune *in vivo*, în ser sau în alte lichide ale organismului, în care antigenul nu este cunoscut, pot fi urmate doua cai:
1) estimarea cantitativa a complexelor imune, cu caracterizarea izotipului de imunoglobulina din complex si componentul complementului, utilizând teste screening conventionale; 2) analiza specificitatii anticorpilor si a antigenului complexat.

Testele screening rapide pentru detectarea complexelor imune se bazeaza pe capacitatea complexelor imune de a interactiona cu receptorii naturali, humorali si celulari. O tehnica clasica este testul legarii C1q, bazat pe capacitatea complexelor imune de a interactiona cu domeniul globular al lui C1q. C1q purificat, radiomarcat, se leaga cu complexele imune si ansamblul rezultat se detecteaza prin metoda excluderii dimensionale cu PEG. O varianta tehnica mai simpla consta în amestecul unei concentratii mici de PEG, cu efect precipitant asupra complexelor macromoleculare si analiza ulterioara a precipitatului. AMC specifici fata de C1q imobilizati pe suport, pot fi utilizati pentru a capta C1q, fixat pe complexele imune *in vivo*, cu evidentierea ulterioara a imunoglobulinei din complex.

Alta metoda pentru detectarea complexelor imune pe o faza solida, consta în utilizarea conglutininei sau a factorilor reumatoizi, pentru captarea complementului legat cu complexele imune. Conglutinina este o proteina din serul normal de bovine, cu proprietatea de a lega componentele complementului.

Complexele imune se pot detecta pe calea utilizarii interactiunii lor cu receptorul Fc de pe suprafata macrofagelor sau plachetelor. Testul cel mai folosit se bazeaza pe folosirea receptorilor pentru C3bi de pe suprafata celulelor limfoblastoide transformate *in vitro*. Testul inhibitiei rozetelor EAC (eritrocite-anticorpi-complement) masoara gradul inhibitiei formarii rozetelor, de catre complexele imune, dintre o subpopulatie de limfocite B circulante si eritrocitele tapetate cu C3.

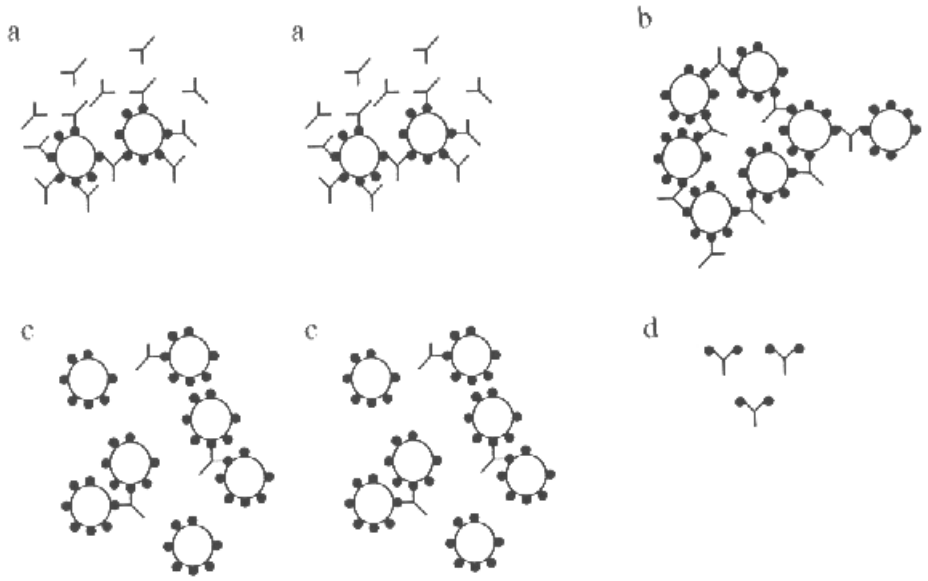
Epurarea complexelor imune si cauzele persistentei lor în organism

Complexele imune persista în organism, datorita incapacitatii organismului de a le elimina. Rata eliminarii este dependenta de mai multi factori:

– dimensiunile complexelor imune
– disponibilitatea proteinelor complementului
– izotipul anticorpilor.

Complexele Ag-Ac de dimensiuni mari sunt eliminate în câteva minute dupa ce s-au format, iar cele de dimensiuni mici circula timp îndelungat. Orice factor care influenteaza dimensiunile complexelor imune, influenteaza rata clearance-ului. Anticorpii fata de antigenele self au adeseori, afinitate mica, ceea ce înseamna formarea complexelor imune mici, cu persistenta îndelungata. In excesul antigenic, caracteristic infectiilor cronice sau maladiilor autoimune, situsurile de legare ale anticorpilor se satureaza si se formeaza, de asemenea, complexe imune de dimensiuni mici.

Fig. 122. *Formarea comple-xelor imune*. Dimensiunile complexelor imune sunt de-pendente de valenta anti-genului si anticorpilor. **a**. În excesul de anticorpi, epitopii sunt saturati si se formeaza complexe mici. **b**. La con-centratii echivalente se for-meaza o retea care aglutineaza sau precipita antigenul. **c**. În excesul de antigen, paratopii anticorpilor se satureaza si complexele imune sunt mici. **d**. Cu un antigen monovalent nu se produc legaturi încrucisate si reactia secundara nu este vizibila.



Complexele imune ce se formeaza în mediul intern sau patrund în circulatie, trebuie sa ajunga în organele care contin celule fixe ale sistemului fagocitar mononuclear. Cea mai mare parte a complexelor imune se leaga pe receptorii de suprafata ai celulelor circulante, prin

intermediul carora sunt transportate în compartimentul în care vor fi retinute de macrofagele fixe.

Complexele imune sunt legate pe receptorii celulelor din compartimentul de transport. Celulele transportoare ale complexelor imune sunt *eritrocitele*. Complexele imune opsonizate cu C3b sunt rapid epurate din circulatie, dupa ce se fixeaza pe *receptorul pentru C3b* de pe suprafata eritrocitelor (receptorul CR 1). Complexele imune mari sunt mai eficiente în legarea C3b si astfel sunt mai usor recunoscute de receptorul eritrocitar. Receptorul eritrocitar pentru C3b se gaseste numai la primate. Neprimatele au receptor pentru C3b, numai pe plachete. Pe suprafata unui eritrocit sunt 50-1000 de receptori. Sunt mobili si gruparea lor în zone membranare distincte (patch), permite legarea complexelor imune, cu mare aviditate. Rolul complementului în medierea legarii complexelor imune a fost sugerat de observatia ca serul inactivat la 55^{o} nu mediaza legarea, iar tratamentul prealabil al serului cu factorul veninului de cobra a avut acelasi efect, ceea ce denota rolul lui C3.

Receptorii pentru C3 ai neutrofilului sunt mult mai numerosi (pâna la 50000), dar rolul esential în transportul complexelor imune revine eritrocitelor, datorita preponderentei lor numerice.

În capilare, eritrocitele circula în curentul axial al coloanei de sânge si nu vin în contact cu celulele endoteliale. Contactul eritrocitelor cu endoteliul se produce în sinusoidele ficatului si splinei, dar si la situsurile la care curgerea sângelui devine *turbionara* (punctele de ramificatie arteriala). În sinusoidele ficatului si splinei, eritrocitele se descarca de complexele imune. Tot aici sunt retinute eritrocitele îmbatrânite. Complementul este foarte important, deoarece mediaza legarea complexelor imune, de macrofagele din sinusoidele splenice si hepatice. Insuficienta cantitativa a complementului diminua clearance-ul splenic, iar consecinta este initierea reactiilor mediate de complexele imune.

Complexele imune neopsonizate cu C3b pot fi rapid captate de ficat prin receptorii pentru Fc, dar ulterior se elibereaza si se depun în tegument, rinichi, articulatii, unde produc reactii inflamatorii.

Persistenta complexelor imune este influentata de izotipul anticorpilor. Complexele cu IgG sunt eliminate mai eficient, iar cele cu IgA persista si se depun.

Deficientele functiei fagocitelor sistemului mononuclear, datorate supraîncarcarii, sunt asociate cu cresterea nivelului complexelor imune circulante.

Depozitarea. Incapacitatea sistemului de transport eritrocitar sau disfunctia diferitelor etape de prelucrare a complexelor imune în

sistemul fagocitar mononuclear, poate duce la persistenta complexelor imune în circulatie si depunerea lor în tesuturi: tegument, articulatii, rinichi, plamân, retina. Depunerea este favorizata de cresterea permeabilitatii vasculare. Rinichiul este organul de electie al depunerii complexelor imune, factorul favorizant fiind presiunea sanguina de 4 ori mai mare în glomerulii vasculari, comparativ cu celelalte capilare. Dar cele mai severe leziuni se produc la situsurile unde circulatia sângelui produce curgere turbionara: la bifurcatia arterelor si în filtrele vasculare (plexurile coroide, corpul ciliar).

Depunerea preferentiala a complexelor imune (în rinichi, articulatii, tegument) este determinata de natura antigenului din complexele imune. Complexele imune cu ADN se asociaza cu membrana bazala a capilarelor (renale, tegumentare)

Persistenta îndelungata a complexelor imune la locul depunerii favorizeaza denaturarea IgG.

IgG denaturat induce sinteza auto-anticorpilor – IgM anti-IgG, care poarta denumirea de *factor reumatoid* (FR). Factorul reumatoid se sintetizeaza *in situ* (în articulatii), în plasmocitele din membrana sinoviala.

Maladii determinate de complexele imune .

Maladia pulmonara a fermierilor este indusa de complexele imune cu anticorpi specifici fata de antigenele actinomicetelor. Actinomicetele se dezvolta abundent pe suprafata materialelor vegetale. Sporii actinomicetelor termofile, inhalati odata cu praful, sunt principalii agenti inductori ai maladiei. Serul pacientilor, *in vitro*, precipita antigenele de actinomicete.

Maladia pulmonara a crescatorilor de pasari este datorata complexelor imune formate *in vivo* cu antigene aviare. Prin expunerea repetata la antigenele aviare, se sintetizeaza IgG si se formeaza complexe imune. Pneumopatiile sunt produse de antigenele de la porumbei, papagali etc. Antigenele de la puii de gaina induc sinteza anticorpilor precipitanti, dar nu produc pneumopatii, deoarece complexele imune nu persista în organism.

Modelul experimental al maladiei cu complexe imune

Fenomenul Arthus este procesul de necroza tisulara, ca o consecinta a formarii complexelor imune *in vivo*, într-un teritoriu delimitat. Este o reactie de inflamatie acuta, indusa în tegumentul de iepure, prin injectarea repetata, în acelasi loc, a serului de cal,

consecutiva modificarilor vasculare si de aceea, reactia se produce numai în teritorii vascularizate. Este o reactie anafilactica locala, în interiorul vaselor si în jurul peretilor vasculari. Fenomenul Arthus se evidentiaza usor, la nivelul tegumentului.

Fenomenul se induce prin injectarea repetata la iepure, subcutan sau intradermic, a serului de cal, la interval de o saptamâna, pâna când în sânge se realizeaza un titru ridicat al IgG anti-proteine heterologe de cal.

Dupa primele 2-3 injectii saptamânale de antigen, nu se observa modificari tisulare. Dupa a 3-a sau a 4-a injectie, la circa 30 de minute, local, apare un edem eritematos moderat care persista câteva ore. Dupa injectiile urmatoare de antigen, edemul este tot mai extins si mai persistent. Dupa 6-7 injectari, se produce necroza locala a tesutului.

Fenomenul Arthus este o reactie de hipersensibilitate locala, caracterizata prin necroza dermica, la locul unde se injecteaza repetat, acelasi antigen. Se sintetizeaza un titru crescut de anticorpi circulanti, iar antigenul este în exces în spatiul extravascular. Se formeaza complexe imune solubile, datorita excesului de antigen.

Din punct de vedere histopatologic, fenomenul Arthus este o *reactie inflamatorie* clasica. La locul injectarii, initial se produce un edem eritematos, curgerea sângelui fiind îngreunata. In lumenul vascular se formeaza trombi plachetari si leucocitari, datorita aderentei plachetelor si leucocitelor de celulele endoteliale: circulatia sângelui se întrerupe si zona se necrozeaza.

Mecanismul celular si molecular al fenomenului Arthus. La locul injectarii repetate a antigenului se formeaza complexe Ag-Ac, cu IgG si IgM. Complexele imune se formeaza extravascular, cu anticorpii adusi pe cale circulatorie, care trec în spatiul extravascular, datorita cresterii permeabilitatii vasculare. Complexele imune se depun pe membrana bazala a capilarului. Se activeaza cascada complementara si se elibereaza C3a si C5a. Anafilatoxinele maresc permeabilitatea vasculara, dar sunt si factori atractanti pentru leucocite (PMNN).

C3a si C5a activeaza mastocitele, din care se elibereaza histamina. Se sintetizeaza leucotriene si, alaturi de histamina, maresc permeabilitatea vasculara si determina aflux de PMNN în spatiul extravascular.

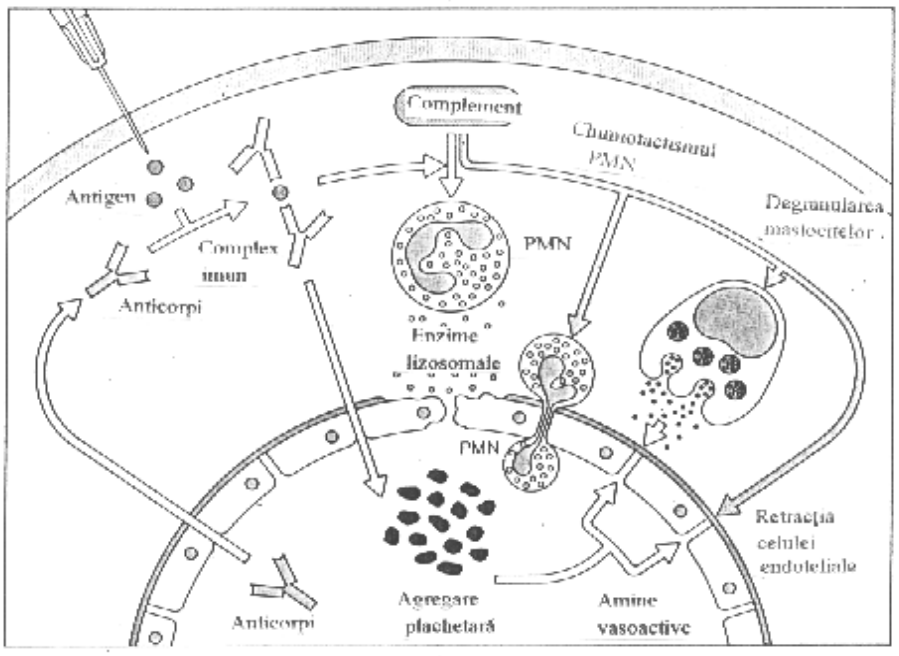


Fig. 123. *Fenomenul Arthus*. Antigenul injectat pe cale intradermica se leaga cu anticorpii circulanti specifici si formeaza complexe imune. Complexele activeaza complementul si activeaza plachetele, care elibereaza aminele vasoactive. Fragmentele C3a si C5a ale complementului provoaca o retractie a celulelor endoteliale, degranularea mastocitelor si atragerea polinuclearelor spre situsul de reactie. Produsele eliberate de mastocite, în special histamina si leucotrienele, induc cresterea debitului sanguin si a permeabilitatii capilare. Reactia inflamatorie este amplificata de enzimele lizosomale eliberate de polinucleare. C3b opsonizeaza complexele imune si usureaza fagocitarea lor (dupa Roitt, 1984).

Din mastocite se elibereaza factorul de agregare plachetara (PAF), iar din plachete se elibereaza amine vasoactive. PMNN extravasculare descarca continutul enzimatic si lezeaza peretele capilar.

Injectarea intradermica a antigenelor fungice sau de actinomicete, la indivizii cu aspergiloza pulmonara si respectiv la cei cu plamân de fermier, produce reactii de hipersensibilitate de tip Arthus.

Ca mecanism intim, fenomenul Arthus este o reactie de hipersensibilitate imediata, deoarece complexele Ag-Ac se formeaza foarte repede, dar manifestarea fenomenului (eritem si edem) este tardiva.

Fenomenul Arthus poate fi transferat pasiv la animale neimunizate, astfel:

– prin injectarea intravenoasa a serului de la un organism la care s-a indus fenomenul Arthus, urmata imediat de injectarea intradermica a antigenului declansator;

– prin injectarea intradermica a antigenului, urmata de injectarea intravenoasa a serului, obtinut de la un organism imunizat fata de antigenul specific.

Modelul clinic al maladiei cu complexe imune

Maladia serului este un fenomen Arthus generalizat, provocat artificial, ca o consecinta a utilizarii terapeutice a unui *ser imun heterolog*.

Serurile imune sunt preparate pe diferite animale (cal, berbec, capra, iepure), în institutele de profil. In perioada 1920-'40, înaintea introducerii antibioticelor în terapia anti-infectioasa, serurile imune s-au folosit pe scara larga, pentru a conferi imunitate pasiva fata de un agent patogen sau o toxina a acestuia.

Dupa un interval variabil, primitorii de ser prezinta un sindrom caracteristic, denumit *boala serului*: febra, adenopatie (cresterea volumului ganglionar), splenomegalie, eritem si urticarie tegumentara, proteinurie, uremie.

În primele 6 zile dupa administrarea serului heterolog, nivelul proteinelor serice heterologe din ser scade foarte lent. Incepând din ziua a 8-a, nivelul lor scade mai rapid, deoarece proteinele straine încep sa fie eliminate prin formarea complexelor imune. Dupa 10 zile de la administrarea serului heterolog (de cal), antigenul liber dispare din circulatie. Proteinele serice heterologe sunt imunogene si induc sinteza anticorpilor, cu care formeaza complexe imune, în excesul de antigen. Odata cu formarea complexelor imune, apar si semnele maladiei serice.

La om, maladia serului se prezinta modificat, ori de câte ori se repeta injectiile de ser. Manifestarile clinice iau aspectul unei reactii anamnestice generalizate (reactie de hipersensibilitate imediata).

Se descriu trei tipuri de reactii:

– *reactia de tip imediat* se desfasoara în 24 de ore, chiar cu necroza tisulara la locul injectarii serului. Se manifesta la persoanele la care reinjectia de ser se face la 12-18 zile de la prima injectie de ser heterolog;

– *reactia de tip accelerat*, cu incubare de 2-6 zile, la persoanele la care reinjectia de ser heterolog survine la 2-6 luni de la prima injectie.

Reactia locala (la locul injectarii serului) este foarte puternica. Moartea poate sa survina prin colaps vasomotor;

– *o reactie dupa dinamica raspunsului imun primar*, la 20-25 de zile, se manifesta dupa administrarea unei singure injectii de ser heterolog si se produce la 50% dintre indivizi.

Mecanismul manifestarilor patologice ale maladiei serului, rezida în *actiunea complexelor imune asupra vaselor sanguine*. În sânge se formeaza complexe Ag-Ac, care se depoziteaza lent în vasele mici (capilare), între endoteliul vascular si membrana bazala, mai ales în ansele glomerulare renale.

Tipul de leziuni renale este dependent de dimensiunile complexelor imune. In conditiile excesului de antigen, complexele imune sunt mici si se depoziteaza în spatiul subepitelial, complexele mari se depun subendotelial.

Complexele depozitate activeaza complementul si determina eliberarea anafilatoxinelor C3a si C5a, care produc degranularea mastocitelor si bazofilelor. Creste permeabilitatea vasculara si sunt atrase neutrofilele. Ele ingera complexele imune si elibereaza enzimele lizosomale, care lizeaza celulele endoteliului vascular si intensifica reactia inflamatorie. Proteinuria însoteste leziunea glomerulara.

Pentru depistarea predispozitiei la accidentele serice de hipersensibilitate fata de serul de cal se utilizeaza diferite teste:

– *proba oftalmica* consta în depunerea unei picaturi de ser heterolog diluat 1/10, pe conjunctiva primitorului de ser. La persoanele hipersensibile, în 30 de minute apare un eritem intens si edem;

– *proba cutanata* consta în injectarea intradermica a cantitatii de 0,1 ml ser heterolog diluat 1/10. La hipersensibili, la locul injectarii, apare o reactie imediata, în 20-30 de minute, cu eruptie urticariana, înconjurata de o zona de eritem. Reactia dispare în 30-60 de minute. Daca este intensa, reactia dureaza 6-12 ore.

Din cauza reactiilor de hipersensibilitate de tipul maladiei serului, seroterapia trebuie sa utilizeze *seruri omologe*.

Maladia serului se induce *experimental*, la iepure, prin injectarea intravenoasa a albuminei serice bovine. Se sintetizeaza anticorpi specifici, care leaga antigenul în exces. Complexele imune, neputând fi eliminate cu o rata egala cu cea a formarii, se depoziteaza pe membrana bazala a glomerulilor renali si în peretele vaselor mici. Complexele imune fixeaza complementul si se elibereaza lent histamina

din bazofile.

Reactiile de hipersensibilitate de tip IV (Hipersensibilitatea întârziata)

Hipersensibilitatea întârziata cuprinde toate reactiile care, dupa clasificarea lui Coombs si Gell (1963), necesita mai mult de 12 ore pentru a deveni evidente.

Reactiile de hipersensibilitate întârziata au urmatoarele particularitati:

– aparitia lor este lenta si atinge amplitudinea maxima la 24-72 de ore de la contactul secundar cu antigenul;

– reactia de hipersensibilitate întârziata nu afecteaza un anume organ tinta, ci este o stare cu rasunet *sistemic*, cu simptome generalizate, ceea ce o deosebeste de reactiile de hipersensibilitate imediata;

– în reactiile de hipersensibilitate întârziata nu se produce liza celulara, cu exceptia cazurilor grave;

– reactiile de hipersensibilitate întârziata nu sunt dependente de factorii humorali (anticorpi) si de aceea nu se transfera prin intermediul serului. Sunt dependente de limfocitele T sensibilizate si se transfera prin suspensia celulara din exudatul inflamator (exudat peritoneal), bogat în limfocite si macrofage;

– nefiind dependenta de molecule proteice circulante, reactiile de hiper-sensibilitate întârziata se manifesta în tesuturile vascularizate si nevascularizate.

Declansatorii reactiilor de hipersensibilitate întârziata

Declansatorii acestor reactii sunt foarte diferiti, dar au o caracteristica functionala comuna, ce consta în aceea ca devin stimuli cronici:

– substante anorganice: $HgCl_2$, sulfat de nichel, compusi ai cromului, colorantii de anilina;

– glucidele, cu rol de haptene, dupa ce *in vivo* se complexeaza cu o proteina purtator;

– substante proteice produse de *M. tuberculosis* (tuberculina), de *Brucella* (brucelina), dar si celulele întregi, al caror perete este rezistent la actiunea anticorpilor si a complementului: celule de *M. tuberculosis*,

vaccinul BCG, *M. leprae, Streptococcus, Staphylococcus, Treponema, Bordetella, Brucella, Listeria, Salmonella*.

– fungii *Candida*, *Histoplasma*;

– parazitii *Schistosoma, Plasmodium, Toxoplasma, Leishmania*;

– virusuri: rujeolic, herpetice, adenovirusuri etc;

– antigenele celulare din grefele de tesuturi si organe.

Modul de administrare a antigenului influenteaza reactivitatea imunitara. Asocierea antigenului cu adjuvantul Freund complet, favorizeaza reactia de hipersensibilitate întârziata, iar injectarea intravenoasa este defavorabila acestui proces.

Reactiile de hipersensibilitate imediata si întârziata coexista pentru orice antigen, cu predominanta uneia sau alteia, fara sa se excluda complet.

Se cunosc trei tipuri de reactie de hipersensibilitate de tip întârziat:

– *reactia întârziata de tip tuberculinic*

– *hipersensibilitatea întârziata de contact*. Ambele tipuri de reactie apar la 48-72 de la reexpunerea la antigen;

– *hipersensibilitatea întârziata granulomatoasa* se manifesta în 21-28 de zile. Granuloamele se formeaza prin agregarea si proliferarea macrofagelor si pot sa persiste un interval de mai multe saptamâni.

1. Reactiile de hipersensibilitate întârziata de tip tuberculinic

Hipersensibilitatea întârziata este o reactie caracterizata printr-un proces inflamator, care devine vizibil macroscopic la 6-12 ore dupa contactul secundar cu antigenul si atinge intensitatea maxima la 24-72 de ore. Histologic se caracterizeaza prin infiltrare limfocitara si mononucleara.

Cea mai cunoscuta reactie de hipersensibilitate întârziata este cea indusa de *tuberculina*, dar antigene ca *lepromina*, *brucelina*, *histoplasmina,* diferite componente ale celulelor de *Candida* etc., produc reactii asemanatoare

Tuberculina este o substanta proteica, netoxica, pe care celulele de *M. tuberculosis* o elimina extracelular. Este inofensiva pentru organismele umane care nu au experienta antigenica a contactului cu *M. tuberculosis* sau cu componente antigenice ale celulelor sale.

R. Koch a descoperit tuberculina, dar si reactiile de hipersensibilitate întârziata la tuberculina, în experiente de genul urmator:

– a inoculat subcutan în regiunea coapsei cobailor normali, o suspensie de celule vii de *M*. *tuberculosis*. Celulele bacteriene se multiplica local si determina o reactie inflamatorie în ganglionii regionali.

Se produce adenopatia tuberculoasa (cresterea volumului ganglionar). Infectia progreseaza lent, se generalizeaza si dupa câteva luni, animalul moare;

– la 2-3 saptamâni de la prima inoculare, R. Koch a reinoculat cobaii cu o noua doza de celule de *M. tuberculosis*, vii sau omorâte.

La locul celui de al II-lea inocul se produce o reactie ampla, caracterizata prin inflamatie masiva în câteva ore, ce progreseaza rapid si în 2-3 zile determina necroza zonei învecinate, urmata de eliminarea brutala a tesutului.

Reactia de necroza si eliminare tisulara, cu o delimitare foarte neta fata de tesutul înconjurator, a fost denumita fenomenul Koch.

Fenomenul Koch este o reactie de hipersensibilitate întârziata si poate fi reprodus prin injectarea corpilor celulari de *M. tuberculosis*, fie numai a tuberculinei.

La organismele infectate sau care au experienta anterioara a contactului cu antigene de *M. tuberculosis* (dobândita prin vaccinare), reinjectarea celulelor de *M. tuberculosis*, vii sau moarte ori a tuberculinei, determina o reactie de hipersensibilitate întârziata severa, cu producerea leziunilor tisulare ce se succed astfel: induratie locala, eritem cu reactie inflamatorie intensa, puroi si necroza, în cazul în care reactia este intens pozitiva. Fenomenul Koch este detrimental pentru gazda, pentru ca *M. tuberculosis* se multiplica repede în tesutul necrotic.

Reactia este locala, dar injectarea unei cantitati mari de tuberculina la un organism sensibilizat, poate produce o reactie sistemica (generalizata), urmata de soc grav si moarte.

Dupa contactul secundar cu antigenele de *M. tuberculosis* se produc doua tipuri de raspuns:

– *o reactie locala*, cu aparitia unei congestii si a unui edem la locul injectiei, însotita de o adenopatie locala;

– *o reactie focala,* ce consta în activarea focarelor de tuberculoza latenta, eventual existente în organism. Focarele latente se activeaza, printr-o reactie inflamatorie locala.

Reactia de hipersensibilitate la tuberculina nu a fost interpretata corect de descoperitorul ei. Koch a injectat tuberculina, ca vaccin, în scop imunoterapeutic, la bolnavii de tuberculoza. Consecinta a fost reactivarea focarelor de latente de infectie tuberculoasa la cei vindecati clinic (asimptomatici) si agravarea tuberculozei la pacientii cu proces infectios evolutiv.

Bacilul *M. tuberculosis* nu are efecte toxice directe asupra celulelor infectate, dar reactiile de hipersensibilitate celulara pot sa determine leziuni tisulare si chiar necroza. De aceea, dupa contactul primar, efectele antigenelor de *M. tuberculosis* sunt minime sau

absente.

Efectorii celulari ai reactiilor de hipersensibilitate întârziata

Celulele efectoare ale reactiei de hipersensibilitate întârziata sunt de doua categorii:

– *celule de origine sanguina*: limfocite T sensibilizate, care recunosc specific antigenul, monocite, bazofile, neutrofile;

– *celule rezidente tisulare*: celule endoteliale vasculare, macrofage tisulare (care înglobeaza antigenul, îl prelucreaza si îl prezinta limfocitelor T), mastocite (îsi elibereaza continutul si modifica permeabilitatea capilarelor).

Recrutarea bazofilelor si neutrofilelor este mediata de chemoatractantii produsi în focar, iar limfocitele T activate produc factori de inhibare a migrarii. Infiltratul celular format din monocite si limfocite patrunde în derm si dezorganizeaza fasciculele de colagen, sub actiunea enzimelor eliberate de macrofage. Monocitele si limfocitele infiltratului se gasesc în proportii egale. In teritoriul focarului inflamator, monocitele se diferentiaza în macrofage.

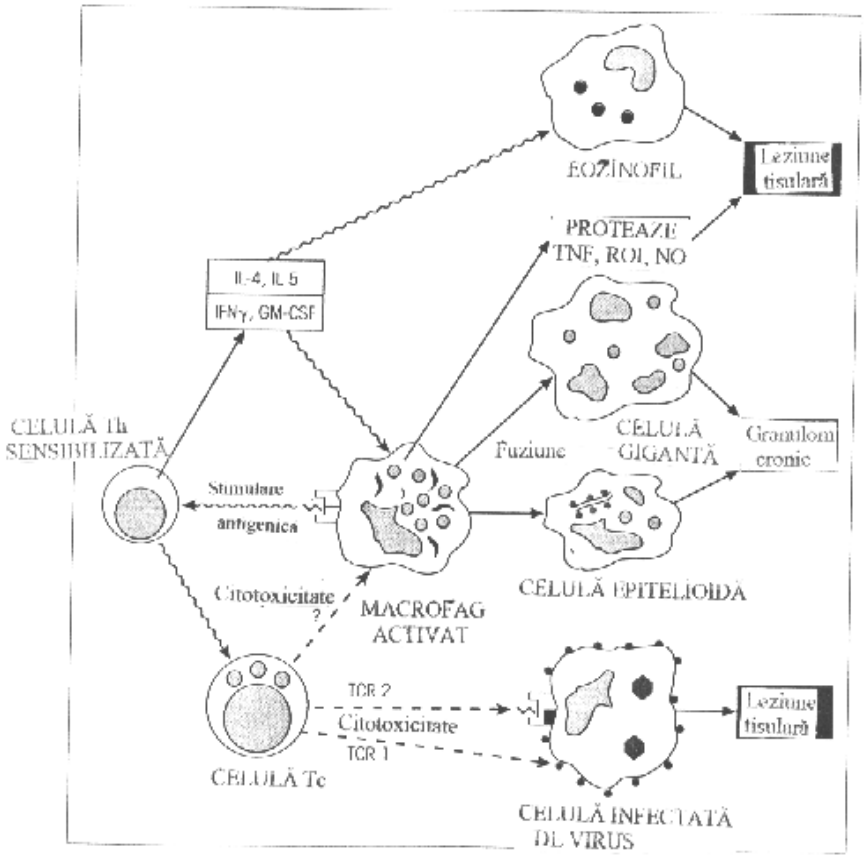


Fig. 124. Bazele celulare ale *hipersensibilitatii de tip IV*.

Macrofagele, celulele dendritice si posibil chiar limfocitele B preiau moleculele de tuberculina, le prelucreaza si le expun în asociatie cu moleculele CMH II. Antigenul este recunoscut de limfocitele TCD_4 si elibereaza limfochine (IL-2, IFN γ), cu efect activator asupra macrofagelor, pe care le retin în focarul inflamator.

Reactia inflamatorie, caracterizata anatomic prin edem si eritem, atinge intensitatea maxima la 48-72 de ore. Daca antigenul este degradat, ulterior, intensitatea reactiei de hipersensibilitate întârziata diminua treptat. Daca antigenul nu poate fi eliminat, persistenta lui determina *reactia granulomatoasa*, cea mai importanta forma de

manifestare a hipersensibilitatii întârziate.

2. Reactia de hipersensibilitate întârziata de tip granulomatos

Reactia granulomatoasa este produsa de antigene persistente, fiind cea care determina efectele patologice ale infectiei cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Granuloamele tuberculos si lepros sunt cele mai cunoscute.

Persistenta celulelor de *M. tuberculosis* si *M. leprae* este atribuita unor factori care împiedica fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoza. Uneori este posibila chiar multiplicarea celulelor de *Mycobacterium*.

Granulomul este indus nu numai de persistenta celulelor de *Mycobacterium*, ci si de încarcarea macrofagelor din focar, cu pulberi nedegradabile (talc, siliciu, azbest, carbune).

Granulomul pulmonar este tipic pentru natura sa imunitara si este consecinta reactiei inflamatorii cronice a tesutului care înconjura celulele infectate cu *M. tuberculosis*. Granulomul este o structura care izoleaza celulele infectate cu *M. tuberculosis* si previne diseminarea lor, fiind alcatuit din doua categorii de celule: *macrofage* si *limfocite T*.

Macrofagele infectate cu *M. tuberculosis* se hipertrofiaza si dobândesc caractere morfologice *epitelioide* sau fuzioneaza si formeaza *celule gigante*. Ele ocupa o pozitie centrala în granulom, iar limfocitele sunt situate la periferie. In jurul celulelor din focar, fibroblastele prolifereaza si sintetizeaza colagen, formând un *tesut fibros* de acoperire.

Granuloamele care contin bacili de *M. tuberculosis* ramân latente pentru zeci de ani, la circa 90% dintre cei aproximativ 2 miliarde de indivizi umani infectati, cu focare de tuberculoza latenta, dar fara manifestari clinice. La restul de 10%, celulele centrale ale granulomului se lizeaza din mai multe cauze: lipsa O_2, proliferarea bacililor tuberculosi, actiunea TNF si a limfocitelor Tc. Consecutiv lizei celulelor din centrul granulomului, se formeaza *granuloame cazeoase* (de consistenta cheagului de cazeina), în interiorul carora celulele de *M. tuberculosis* se dezvolta foarte bine. Dupa ruperea peretelui fibros, bacilii se disemineaza prin contiguitate în tesutul adiacent, pe cale sanguina, în alte organe sau pe cale aeriana, la alti indivizi.

Raporturile numerice si functionale dintre limfocite si macrofage, determina intensitatea reactiilor de hipersensibilitate întârziata si conditioneaza chiar formarea granulomului. Argumentul este infectia cu *M. leprae*, care determina doua tipuri extreme de manifestari:

– *lepra leproida,* asociata cu leziuni multiple si un numar enorm de bacili în leziuni. Testul la lepromina este pozitiv. Proliferarea bacililor

produce leziuni tegumentare distribuite difuz sau localizate în noduli. Un numar enorm de bacili de *M. leprae* se gaseste în granuloamele lepromatoase (peste 10^{10}/gram de tesut). Granuloamele sunt formate din macrofage inactive, gigante, provenite prin fuziune, încarcate cu bacili. Lipseste infiltratul limfocitar, ceea ce dovedeste absenta imunitatii mediate celular. S-a demonstrat *anergia celulelor T*, cu specificitate fata de antigenele bacilului leprozei. Anergia IMC este explicata prin predispozitia genetica, prin deletia clonala a celulelor T specifice fata de antigenele de *M. leprae* si prin functia inhibitorie a celulelor Ts specifice. Macrofagele sunt pline cu bacili si chiar dupa chimioterapie prelungita, bacilii sunt eliminati lent.

– *lepra tuberculoida* este o boala localizata, cu granuloame bine organizate, în care macrofagele sunt diferentiate în celule epitelioide, celule gigante Langhans active, care omoara si digera bacilii de *M. leprae*. Infiltratul limfocitar al granulomului este intens, cu predominanta limfocitelor TCD_4, care secreta interferon gama. Interferonul activeaza macrofagele din focar, devenind capabile sa inhibe cresterea si diviziunea celulelor de *M leprae*. La periferia granulomului se gasesc limfocite TCD_8. Leziunile nervilor se datoreaza proliferarii bacililor si raspunsului IMC, în situsuri adiacente filetelor nervoase.

Desi intensitatea reactiei de hipersensibilitate întârziata este reflectarea directa a gradului de activare a limfocitelor TCD_4, ea nu confera totdeauna imunitate. Starile de hipersensibilitate întârziata si de imunitate nu se induc reciproc.

Macrofagele activate de limfocite pot nu numai sa inhibe cresterea si diviziunea celulelor de *Mycobacterium*, dar pot sa produca leziuni tisulare, consecutiv eliberarii continutului lor enzimatic si prin producerea intermediarilor reactivi ai reducerii O_2.

Teste in vivo pentru detectarea hipersensibilitatii întârziate

Pentru testarea reactiei de hipersensibilitate întârziata la tuberculina, se folosesc doua tipuri de preparate:

– *tuberculina Koch* (alt = old tuberculin) este filtratul brut al culturii de *M. tuberculosis* în mediul lichid, vechi de câteva saptamâni, concentrat în baie de vapori la 1/10 din volumul initial;

– *substanta activa denumita PPD* (*p*urified *p*rotein *d*erivative), de natura proteica. Produsul este partial purificat din culturile de *M. tuberculosis* autoclavate, prin precipitare cu sulfat de amoniu, fiind un amestec al mai multor fragmente proteice cu greutatea moeculara de 5000 D. Nu se cunosc epitopii declansatori ai activarii limfocitelor TCD_4.

Se pastreaza în stare liofilizata.

Cel mai folosit este testul *intradermic* (*i*ntra*d*ermo*r*eactia = IDR), denumit si testul Mantoux, ce consta în injectarea unui volum de 0,1 ml din preparatul de PPD. Reactia se citeste la 24-48 de ore. Se apreciaza aria eritemului, gradul infiltratiei dermice (edemul) sau chiar necroza tisulara indusa de antigenul test.

La persoanele pozitive pentru reactia de hipersensibilitate întârziata, apare o induratie locala (întarire a tesutului) eritematoasa. Zonele de induratie de 0,5 cm sau mai mari sunt înregistrate ca pozitive. Reactia de intensitate medie dispare în 2-3 zile si denota ca organismul a fost vaccinat. La cei cu reactie intens pozitiva, manifestarile sunt mai severe, cu febra usoara, alterarea starii generale, dureri ale membrelor, ce se instaleaza dupa 24 de ore. La locul injectarii tuberculinei, tesutul se necrozeaza. Reactia ampla se datoreaza focarelor multiple latente de tuberculoza, existente în organism.

În absenta reactiei tisulare (absenta edemului si a eritemului), reactia de hipersensibilitate întârziata este negativa. Semnificatia este ca persoana nu are experienta contactului anterior cu antigenele de *M. tuberculosis*, nici prin vaccinare si nici prin infectie naturala.

Testul *alergiei de contact* se foloseste pentru evaluarea alergiei tegumentare si consta în impregnarea unei fibre textile cu tuberculina (sau cu oricare substanta test), fixata pe leucoplast si aplicare tegumentara pentru o perioada mai lunga de timp. Alergenul patrunde în tegument. La 48-72 de ore apar reactii eritematoase.

Aceleasi teste se folosesc pentru evaluarea gradului de sensibilizare a organismului fata de *Brucella, L. monocytogenes, T. pallidum*, fata de boli parazitare (toxoplasmoza, malarie etc.), fata de infectiile virale, fungice.

In vitro, cel mai folosit este testul *proliferarii limfocitelor*. Suspensia de limfocite se obtine din sânge si se cultiva în mediu cu ser de vitel si antibiotice. Celulele sunt stimulate cu PHA, Con A, PWM sau cu preparate antigenice din *Candida*, anatoxina tetanica, PPD sau orice antigen relevant pentru maladia pacientului. In studiile cu lectine mitogene, celulele se marcheaza cu timidina H^3 si culturile se sacrifica la 2-3 zile. Culturile stimulate cu antigene se sacrifica la 6-7 zile.

Sinteza ADN în culturile stimulate cu mitogen sau cu antigene, se compara cu sinteza ADN în cultura martor.

PHA si Con A sunt mitogeni ai limfocitelor T. PWM induce proliferarea si maturarea limfocitelor B, dar raspunsul lor necesita functia accesorie a limfocitelor T.

În culturile stimulate cu antigene, prolifereaza limfocitele TCD_4. Raspunsul limfocitelor reflecta gradul de sensibilizare printr-o expunere anterioara a subiectului, la antigenul test.

Raspunsul limfocitelor T la aloantigene se masoara în *reactia limfocitara mixta* (RLM), în care celulele de la doi indivizi se cultiva împreuna. In reactia unidirectionala, una din cele doua populatii de limfocite se inactiveaza prin iradiere sau tratament cu mitomicina C. Ele nu sintetizeaza ADN propriu, dar stimuleaza limfocitele celeilalte populatii. Sinteza ADN se determina prin masurarea H^3, dupa cel mult 7 zile. In RLM prolifereaza limfocitele TCD_4 si TCD_8.

3. *Hipersensibilitatea de contact (dermatita de contact)*

Hipersensibilitatea de contact, la om, se prezinta ca o *inflamatie a tegumentului*, adica o leziune tegumentara cu eritem, edem moderat si distrugerea epiteliului la locul de contact cu alergenul. Reactia este maxima la 48-72 de ore dupa contactul secundar.

Dermatita alergica de contact este o forma de hipersensibilitate întârziata si este rezultatul sensibilizarii limfocitelor. Unele haptene (de exemplu, dinitroclorbenzenul), sensibilizeaza aproape toti indivizii umani.

Moleculele *inductoare* ale hipersensibilitatii de contact sunt mici (sub 1 kD), dar se comporta ca haptene: compusi ai Ni, Co, Cr (bicromatul de K), ai Hg, cauciucul, compusi acrilici, esentele de lemn care contin substante toxice (otetar veninos, stejar veninos), formolul, unele substante cosmetice, diferite rasini, unii coloranti(de anilina), pesticide, antiseptice, antibiotice, anestezice.

Reactia de hipersensibilitate de contact se desfasoara în doua faze:

1) *Faza de sensibilizare* (faza contactului primar). Moleculele mici (mai mici de 500 D) de orice provenienta, traverseaza tegumentul si se leaga covalent sau necovalent cu proteine tisulare constitutive, în special cu colagenul, prin gruparea NH_2 a lizinei. Astfel se formeaza, *in vivo*, un *conjugat haptena-proteina*, recunoscut de sistemul imunitar al tegumentului. Celulele Langerhans, localizate în straturile suprabazale ale epidermei sunt principalele celule prezentatoare ale antigenului. Ele exprima la nivel membranar, molecule CMH II, precum si receptori pentru regiunea Fc si pentru componentele complementului. In faza de sensibilizare, celulele Langerhans transporta conjugatul antigenic, fie internalizat, fie asociat membranei, de la nivelul tegumentului, în ganglionii limfatici regionali.

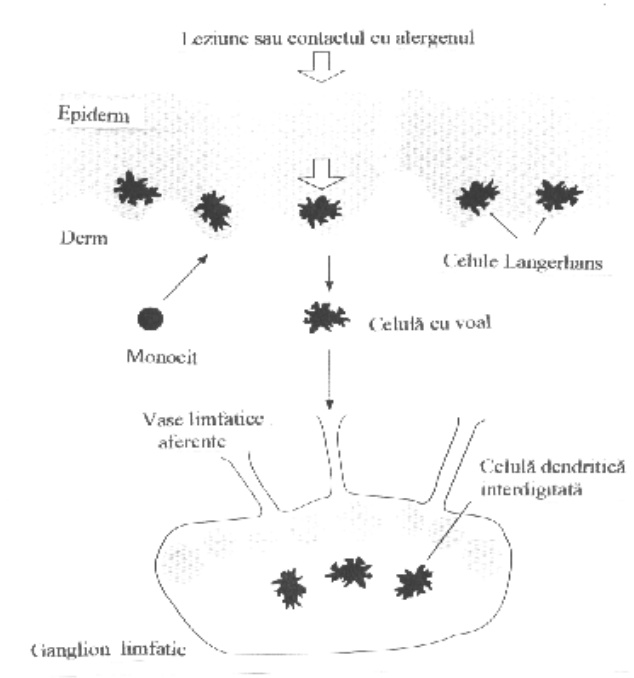


Fig. 125. *Migrarea celulelor Langerhans* din epiderm, în ganglionul limfatic. Antigenele sunt prelucrate în epiderm de catre celulele Langerhans si stimulii produsi de cheratinocite, stimuleaza migrarea celulelor în ganglionii limfatici, unde se diferentiaza în celule dendritice prezentatoare de antigen. Celulele Langerhans sunt înlocuite de precursori derivati din monocitul circulant (dupa Sminia, 1998).

Antigenul sensibilizant este recunoscut de limfocite T neangajate (naive). Ele se activeaza la distanta de locul patrunderii antigenului, în ganglionii limfatici regionali. In ganglioni, antigenul este prezentat limfocitelor TCD_4. Celulele T sunt prezente în tegument (si în alte tesuturi), în numar nesemnificativ, dar în ganglioni, contactul celulelor T cu celulele prezentatoare de antigen este foarte mult usurat de densitatea mare a ambelor tipuri celulare. In raspunsul imun primar, stimularea celulelor T poate sa nu fie evidenta, deoarece se produce în ganglioni si nu la locul contactului cu antigenul. Celulele T neangajate, de dimensiuni mici, se activeaza, se produce expansiunea clonala si diferentierea în celule efectoare si celule de memorie cu specificitate fata de haptena. Numarul lor creste cu câteva ordine de marime. Din ganglion, celulele T sunt diseminate în sângele periferic, iar de aici,

probabil prin homing specific, în tegument la situsul de contact cu antigenul, unde elibereaza citochine.

Între contactul sensibilizant si cel de al II-lea contact este necesar un interval de 10-14 zile.

2) *Reactia propriu-zisa* se produce dupa cel de al II-lea contact cu alergenul si se exprima ca o dermatita. Dupa stimularea secundara cu antigenul, se produce inflamatia deschisa a pielii (leziunea tegumentara).

Celulele Langerhans care au legat conjugatul haptena-proteina, se deplaseaza din epiderm spre derm si secreta mediatori atractanti pentru limfocitele TCD_4 de memorie. Acestea secreta IFN γ, care determina exprimarea moleculelor CMH II pe suprafata *cheratinocitelor* si a *celulelor endoteliale ale capilarelor dermice*. În conditii patologice, cheratinocitele exprima molecule CMH II si pot sa prezinte antigenul. Ele se activeaza si secreta IL-1 si alte interleuchine. IL-1 stimuleaza celulele Langerhans si limfocitele infiltrate în aria de contact cu antigenul. Interleuchinele sunt factori atractanti pentru macrofage si limfocite, fara specificitate de antigen. Aceste celule infiltreaza dermul si epidermul în 48 de ore. Majoritatea celulelor infiltrate sunt limfocite TCD_4, iar circa 99% dintre ele nu au specificitate fata de antigen. In infiltrat lipsesc PMNN. Mecanismul principal pentru recrutarea celulelor T, este activarea independenta de specificitatea antigenica.

Celulele infiltrate – limfocite si macrofage – secreta factori cu actiune litica asupra celulelor epidermice.

Un mecanism alternativ al producerii leziunii, consta în actiunea limfocitelor T de memorie. Reactia inflamatorie locala este initiata de un numar minim de limfocite T de memorie, teoretic una singura. Dupa contactul primar cu alergenul, în aria tegumentara migreaza un numar mic de limfocite T de memorie. Celulele T de memorie sunt stimulate secundar pe calea receptorului specific. Dupa stimulare, secreta citochine atractante pentru celulele efectoare nespecifice (limfocite si macrofage).

La om, dermatitele de contact sunt profesionale: dermatita la ciment, la uleiuri minerale, la medicamente, la coloranti etc.

Testarea hipersensibilitatii de contact se face prin aplicarea substantei direct pe tegument. Reactia se citeste dupa 48 de ore. Reactia pozitiva este însotita de eritem si de eruptie veziculara.

2. Conflictul imunitar *in vivo*. Maladiile autoimune

În 1900, Ehrlich si Morgenroth au formulat conceptul “horror autotoxicus”, care semnifica faptul ca, în mod normal, organismul îsi tolereaza propriile componente, pe care le protejeaza fata de autodistrugerea pe calea efectorilor raspunsului imun. Sistemul imunitar este tolerant fata de componentele proprii. Starea de toleranta fata de self se instaleaza în cursul dezvoltarii embrionare. Una din axiomele Imunologiei este ca, la organismele cu reactivitate imunitara normala, nu se produc anticorpi fata de constituientii proprii organismului. Totusi, autoanticorpii apar mai ales la persoanele în vârsta: sunt autoanticorpi anti-hematii sau anti-membrana bazala glomerulara.

Starea de toleranta perfecta a sistemului imunitar fata de componentele self, este perturbata în unele situatii în care se sintetizeaza autoanticorpi sau se diferentiaza limfocite autoreactive, care nu mai recunosc selful. Prin extinderea efectelor sale, starea de autoreactivitate imunitara genereaza *maladiile autoimune*. Maladiile autoimune, în esenta, se caracterizeaza prin expansiunea proliferativa a limfocitelor reactive fata de componentele self.

Reactivitatea imunitara fata de self nu s-a evidentiat niciodata ca fiind factorul initiator primar al maladiilor autoimune, chiar daca self-reactivitatea a amplificat manifestarile patologice cu componente autoimune. Exista maladii cu fenomene autoimune bine exprimate, dar etiologia lor primara nu se cunoaste.

Mecanisme ipotetice ale initierii conflictului autoimun

Mecanismele celulare si moleculare prin care este perturbata starea de toleranta a sistemului imunitar fata de self, nu se cunosc, dar faptele de observatie au condus la urmatoarele ipoteze:

a) *Eliberarea antigenului sechestrat*. Starea de toleranta fata de self se induce în timpul dezvoltarii embrionare. Antigenele sechestrate sunt acelea care, prin localizarea sau prin particularitatile de vascularizatie ale unui tesut, sunt inaccesibile recunoasterii de catre celulele limfoide, în perioada dezvoltarii embrionare. Ele au localizare intracelulara sau sunt delimitate prin bariere anatomice. In situatii normale, antigenele sechestrate nu stimuleaza nici starea de toleranta si nici nu induc raspunsul imun, datorita absentei contactului lor cu

limfocitele. Din diferite cauze (traumatisme, interventii chirurgicale, procese infectioase), antigenele sechestrate se elibereaza si devin accesibile limfocitelor, declansând raspunsul imun. Un astfel de mecanism patogen s-a presupus ca este activ în generarea *oftalmiei imune* si în *aspermia autoimuna a tubilor seminiferi*. Proteinele cristalinului, în cursul interventiilor chirurgicale, dupa traumatismele ce sparg capsula sau dupa afectiunile care permeabilizeaza cristaloida, se comporta ca antigene care declanseaza un raspuns imun anti-cristalin. Astfel, pot fi afectate irisul, procesele ciliare, coroida. Proteinele spermatice, în cazurile de spermostaza, induc sinteza locala a anticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii reactioneaza cu antigene acrosomale sau flagelare ale spermatozoizilor si produc imobilizarea sau chiar aglutinarea lor, consecinta fiind *sterilitatea autoimuna*. Prin acelasi mecanism, al eliberarii antigenului sechestrat, se pot declansa alte maladii autoimune: *afectiuni demielinizante ale SNC, tiroidita Hashimoto*. Sistemul nervos central si tiroida sunt delimitate de bariere anatomice etanse, care nu permit accesul efectorilor sistemului imunitar. Dupa traumatisme, interventii chirurgicale sau consecutiv unor infectii distructive, antigenele specifice acestor tesuturi, se pot elibera si patrund în circulatie. Fata de ele se poate declansa raspunsul imun, generator al maladiilor demielinizante cu componenta autoimuna si al tiroiditei autoimune.

b) *Pierderea starii de toleranta*, ca mecanism posibil al generarii starilor de autoimunitate, este tot mai mult acceptata. Datorita unor mutatii, ar fi posibila aparitia *clonelor de celule limfoide* imunocompetente, care pierd proprietatea de toleranta fata de self. Limfocitele T si B autoreactive, genereaza efectorii raspunsului imun care interactioneaza specific cu componentele self. Aparitia clonelor autoreactive ar fi asociata cu un deficit al celulelor Ts, precum si cu activarea celulelor Th.

c) *Modificarea structurii chimice a antigenelor proprii* (teoria selfului alterat). Sub actiunea unor *factori fizici* (arsuri, radiatii), *biologici* de natura infectioasa (bacterii, virusuri, fungi) sau a unor substante *chimice* (medicamente), proteinele proprii se modifica si expun determinanti antigenici interni sau se altereaza configuratia lor moleculara. Moleculele modificate devin autoantigene.

Virusurile învelite au un rol important în generarea autoanticorpilor, deoarece, pe suprafata celulelor infectate sunt expuse antigene virale, care pot sa modifice specificitatea antigenica a

moleculelor proprii membranei celulare. Virusurile învelite înmuguresc prin membranele celulei gazda si pot încorpora proteine ale membranei celulare. Virusul este neutralizat de anticorpi, iar complexul imun este ingerat de macrofag prin intermediul receptorilor pentru Fc. Odata cu glicoproteinele virale, pe suprafata macrofagului vor fi expuse si glicoproteine originare în celula gazda. Astfel sunt stimulate limfocitele T fata de proteinele self.

d) *Asemanarea antigenica între antigenele exogene si componentele self*. Uneori, microorganismele infectioase contin molecule asemanatoare, înrudite antigenic cu componentele self. Se sintetizeaza anticorpi care recunosc nu numai antigenul invadant, ci si propriile componente. De exemplu, peretele de *Str. haemolyticus* contine *proteina M*. Anticorpii anti-proteina M reactioneaza încrucisat cu proteine membranare ale celulelor muschiului cardiac. Unele antigene exogene, de origine bacteriana, stimuleaza sinteza anticorpilor ce dau reactii încrucisate cu molecule ale suprafetei hematiei. De aceea, infectia cu *Str. haemolyticus* produce, uneori, leziuni ale miocardului.

Maladiile infectioase (sifilis, lepra) stimuleaza sinteza autoanticorpilor (factorul reumatoid, anticorpi anti-tiroidieni) si acestia ar putea fi cauza dezechilibrului mecanismelor imunologice centrale. Raspunsul autoimun este declansat *de novo* sau cel preexistent este amplificat dupa infectia cu o larga varietate de virusuri ADN si ARN,

La animalele de experienta, infectiile virale acute si persistente pot induce sau pot accelera evolutia maladiei autoimune.

e) Activarea raspunsului imun poate fi *rezultatul întreruperii starii de echilibru a retelei idiotipice.* Limfocitele sunt legate într-o retea functionala complexa, prin interactiuni ce implica regiunile variabile ale receptorilor de antigen. Limfocitele T au receptor de antigen cu regiuni variabile si stimuleaza raspunsul anti-idiotipic. In mod normal, în absenta stimulului antigenic, interactiunile celulare mentin sistemul imunitar în echilibru, dar la contactul cu antigenul, reteaua se orienteaza în sensul elaborarii raspunsului imun specific. Ulterior, datorita semnalelor supresoare, reteaua se întoarce la starea de echilibru. Interactiunile idiotipice pot avea rol stimulator sau inhibitor al raspunsului imun. Anticorpii anti-idiotipici, care în mod obisnuit au rol reglator, pot fi autoanticorpi.

f) *Supravietuirea limfocitelor autoreactive*. In timus, clonele de limfocite self-reactive sunt eliminate. In organism, ramân totusi clone cu o autoreactivitate medie. Ele nu sunt agresive fata de propriile antigene, dar pot deveni foarte reactive, dupa ce s-au activat sub actiunea unui antigen exogen. Dupa activare, prolifereaza si ataca tesutul self. Daca

limfocitele supravietuiesc mai mult decât este necesar, efectul actiunii lor se extinde. Mecanismul supravietuirii limfocitelor activate pare a fi implicat în generarea *lupusului sistemic eritematos* si a *artritei reumatoide*. Supravietuirea limfocitelor se datoreaza producerii unor molecule ce blocheaza ligandul *Fas*. Astfel, ligandul *Fas* nu se mai leaga specific cu receptorul *Fas* si transmiterea mesajului mortii în limfocit este blocata.

g) *Stimularea policlonala a limfocitelor B*. Unii agenti infectiosi, ca de exemplu virusul Epstein-Barr, infecteaza limfocitele B si produc activarea policlonala. Ele strabat câteva cicluri de diviziune si sintetizeaza anticorpi cu specificitati multiple de combinare, unii fiind autoanticorpi. Micoplasmele sunt activatoare policlonale ale limfocitelor si pot contamina preparatele virale. Frecvent, virusurile infecteaza limfocitele si macrofagele, stimulând astfel eliberarea citochinelor. Aceste molecule influenteaza nivelul de exprimare a moleculelor CMH I si II, modulând raspunsul imun.

h) *Influentele hormonale*. Numeroase observatii clinice sugereaza o corelare directa între dezechilibrele hormonale si momentul declansarii maladiilor autoimune. Maladiile autoimune sunt mai frecvente la femei, iar barbatii cu fenomene autoimune au un nivel mai crescut de hormoni estrogeni. Sarcina se asociaza cu ameliorarea severitatii maladiilor autoimune, în special a artritei reumatoide.

j) *Factorii genetici*. Maladiile autoimune tind sa aiba o incidenta familiala, ceea ce sugereaza substratul genetic predispozant la maladiile autoimune.

Inducerea experimentala a maladiilor autoimune

Prima manifestare autoimuna s-a indus experimental la iepurii injectati cu mojarat corneean bovin. S-au sintetizat anticorpi care au reactionat cu antigenele corneii bovine, dar si cu antigenele tesutului corneean de iepure, atât *in vivo*, cât si *in vitro*. In anii ’30, Rivers si colab. au indus encefalomielita la maimuta, prin injectarea mojaratului de creier

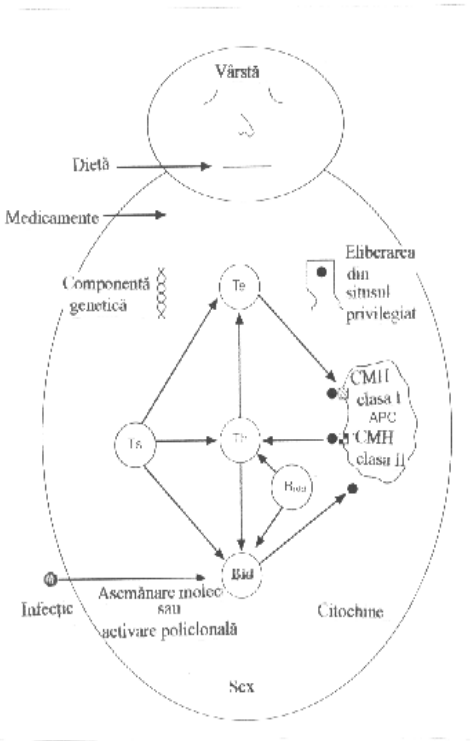


Fig. 127. Natura multifactoriala a *fenomenelor autoimune*. B_{id} = celula B care secreta autoanticorpi; B_{alfaId} = celula B care secreta anticorpi anti-idiotipici; Te = celula T efectoare.

Ulterior, s-a demonstrat ca cea mai sigura modalitate experimentala de a induce o manifestare autoimuna, este injectarea mojaratului tisular singenic, alogenic sau xenogenic, în asociatie cu adjuvantul Freund. Se sintetizeaza anticorpi care reactioneaza cu antigenul inductor, dar si cu componentele tisulare self asemanatoare. Anticorpii fata de constituientii tiroidieni si tiroidita pot fi induse prin imunizarea iepurilor cu mojarat tiroidian, asociat cu adjuvantul Freund complet. S-a dedus astfel ca unul din mecanismele producerii maladiilor autoimune este similar mecanismului sintezei autoanticorpilor, adica prin stimularea cu antigene înrudite. In sprijinul afirmatiei, exista cazuri de analogie directa.

Encefalomielita autoimuna, consecutiva administrarii vaccinului rabic, este declansata de antigenele tesutului nervos de iepure (mielina). Preparatul vaccinal atenuat, utilizat chiar de Pasteur, era maduva spinarii de la iepurele infectat cu virus rabic, uscata si macerata.

Capacitatea antigenelor înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reactioneaza încrucisat cu componente proprii, are ca rezultat întreruperea starii de toleranta. De exemplu, utilizarea preparatelor de insulina din pancreasul de bovine sau de porc, a creat dificultati majore în tratamentul pacientilor cu diabet insulino-dependent, deoarece insulina bovina difera de cea umana prin 3 aminoacizi, iar insulina de porc, printr-un singur aminoacid. Aceste diferente sunt suficiente pentru stimularea reactivitatii imunitare a receptorului de insulina. O complicatie suplimentara a fost generata de faptul ca preparatele de insulina sunt contaminate cu *proinsulina*. Insulina se sintetizeaza în celulele B insulare, ca *preproinsulina*, care, fata de proinsulina are o catena de 20 de aminoacizi la capatul N-terminal. Dupa clivarea acestei catene, ramâne proinsulina, în care aminoacidul 1 din catena A este reunit cu aminoacidul 30 din catena B, prin catena C. Proinsulina este convertita la insulina si este depozitata în granule, de unde este eliberata în circulatie. Proinsulina nu se gaseste în mod normal în circulatie si nu induce starea de toleranta. De aceea, administrarea proinsulinei induce sinteza autoanticorpilor anti-insulina.

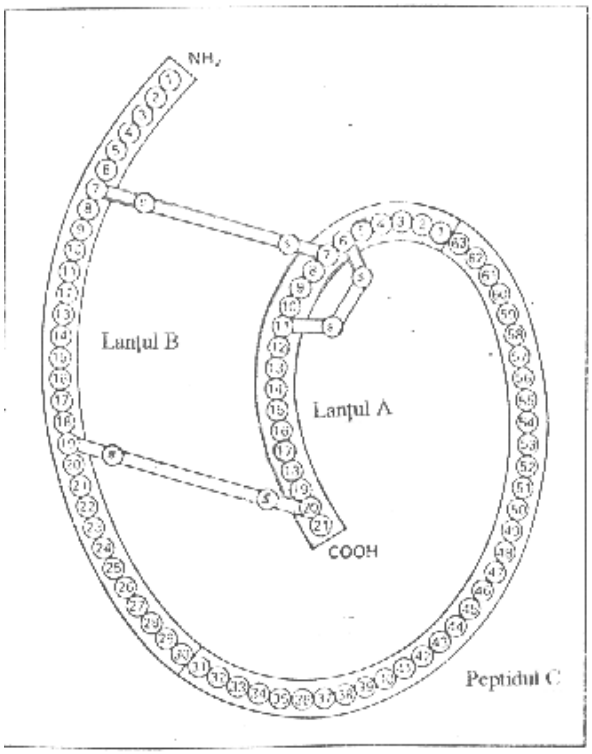


Fig. 128. Structura primara a *proinsulinei*, molecula precur-soare a insulinei dupa clivarea enzimatica a peptidului C. Proinsulina este în mod obisnuit, sechestrata de contactul cu sistemul imunitar, dar daca se elibereaza în circulatie, activeaza sinteza anticorpilor care se combina cu molecula de insulina. Catenele A si B ale insulinei sunt legate prin punti S-S.

Întelegerea naturii chimice a multor autoantigene este insuficienta, iar auto-anticorpii se detecteaza observând legarea lor de sectiunile tisulare, prin tehnica *imunofluorescentei*. Sectiunea tisulara este foarte complexa din punct de vedere antigenic si interpretarea rezultatelor necesita experienta si prudenta.

Mecanisme celulare si moleculare ale progresiei maladiilor autoimune

Indiferent de mecanismul declansator, maladiile autoimune se caracterizeaza prin sinteza autoanticorpilor sau prin generarea limfocitelor T autoreactive. Leziunile tisulare consecutive actiunii efectorilor imunitari, se produc pe una din urmatoarele cai:

– autoanticorpii au, uneori, o actiune *directa* fata de antigenele tisulare cu care formeaza complexe imune. Se activeaza complementul si rezultatul este liza celulelor;

– alteori, autoanticorpii au actiune *indirecta*. Complexele imune (Ag - Ac - C) se depun la nivelul vaselor mici (arteriole, capilare) din diferite organe si produc reactii inflamatorii, consecinta fiind distrugerea tesutului;

– în alte cazuri, tesutul tinta este lezat sub actiunea *limfocitelor Tc* infiltrate.

La pacientii la care se sintetizeaza autoanticorpi, maladiile autoimune au o particularitate comuna: *inflamatia cronica* fara o cauza infectioasa cunoscuta. Autoanticorpii pot initia procesul patologic, pot contribui la patogeneza si sunt utili pentru diagnostic. In evaluarea semnificatiei autoanticorpilor trebuie avute în vedere urmatoarele situatii: 1) autoanticorpii pot fi *agentii efectori* ai maladiei, ca de exemplu, în anemia hemolitica autoimuna; 2) alteori, dupa lezarea unor tesuturi (nervos, cardiac) se sintetizeaza autoanticorpi care reactioneaza cu tesuturile respective; 3) autoanticorpii semnifica prezenta unui agent etiologic, fara sa aiba rol în patogenitate si indica originea infectioasa a maladiei; 4) autoanticorpii se gasesc uneori, mai ales la vârstnici, în absenta manifestarilor patologice.

Unele maladii autoimune se caracterizeaza prin procese patologice *strict localizate*, adica efectorii (în special anticorpii) au actiune specifica fata de antigenele proprii organului sau tesutului tinta. Astfel, în maladia autoimuna *diabetus melitus* insulino-dependent, auto-anticorpii au specificitate numai fata de celulele B din insulele Langerhans, iar în *tiroidita Hashimoto*, autoanticorpii sunt specifici fata de celula epiteliala tiroidiana.

La centrul spectrului se situeaza leziunile care tind sa fie localizate într-un singur organ, dar autoanticorpii nu au specificitate de organ. Exemplul tipic este *ciroza biliara primara,* în care, canaliculele biliare sunt tinta infiltrarii cu celule inflamatorii, dar anticorpii serici, în special

anti-mitocondriali nu au specificitate de organ (nu sunt specifici fata de mitocondriile hepatice). De asemenea, în sindromul Goodpasture, autoanticorpii se fixeaza pe membrana bazala a glomerulului renal si a epiteliului alveolar, producând glome-rulonefrita cronica si hemoragii pulmonare.

La cealalta extremitate a spectrului sunt *maladiile autoimune diseminate*, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor fata de antigene cu distributie tisulara larga (de exemplu, anticorpi anti-nucleari în lupusul eritematos diseminat).

Spectrul maladiilor autoimune	*Organ sau tesut afectat*	*Antigenul*
Tiroidita Hashimoto	Tiroida	Tiroglobulina
Mixedemul primar	Tiroida	Citoplasma, suprafata celulei
Maladia Basedow (tireotoxicoza)	Tiroida	Receptorul pentru TSH al suprafetei celulare
Anemia pernicioasa Biermer (deficitul vitaminei B_{12})	Mucoasa gastrica	Factorul intrinsec (FI)
Diabetul juvenil	Celulele B insulare	Citoplasma celulelor insulare
Unele alergii atopice	Sistemul nervos periferic	Receptorul beta-adrenergic
Myasthenia gravis	Muschi striat si cardiac	Receptor de acetilcolina
Sterilitatea masculina	Spermatozoid	---------- Citoplasma
Maladia lui Addison	Celulele corticosuprarenalei	Citoplasma celulelor pro-ducatoare de steroizi
Menopauza precoce	Ovar	
Anemia hemolitica autoimuna	Hematii	Suprafata hematiei Suprafata plachetelor
Purpura trombocitopenica idiopatica	Plachete	Celula hepatica, actina Piruvat dehidrogenaza mitocondriala
Hepatita cronica activa fara HBs	Ficatul si muschiul neted	Regiunea Fc a moleculei de IgG
Ciroza biliara primara	Mitocondrii	Membrana bazala ADN, ADN-proteine, IgG
Poliartrita reumatoida	Membrana sinoviala	Lipopolizaharidul celulelor epiteliale
	Rinichi si plamâni	Mitocondrii, nuclei

Sindromul Goodpasture		Membrana bazala a epidermei
	Distributie difuza	
LED		Miofibrilele si sarcolema celulei musculare cardiace
	Mucoasa colonului	
Colita ulcerativa		ARN, miozina
	Glande lacrimale si salivare	
Sindromul Sjogren		
	Tegumentul	
Pemphigus vulgaris		
	Muschiul cardiac	
Cardiomiopatia autoimuna		
	Muschiul striat	
Miozita		

Autoanticorpii se sintetizeaza preponderent, fata de antigenele tesuturilor endocrine: tiroida, corticosuprarenale, celulele insulare pancreatice, paratiroide, hipofiza, ovar. Titrul cel mai crescut se înregistreaza în cazul maladiei tiroidiene.

Autoanticorpii pot fi specifici fata de diferite componente antigenice:

– fata de molecule ale suprafetei celulare si au rol patologic(ca de exemplu, anticorpii anti- receptori de hormoni);

– fata de tinte extracelulare (molecule circulante sau ale matricei extracelulare) si pot fi agravanti ai maladiei autoimune;

– fata de componente intracelulare.

Autoanticorpii au specificitate fata de molecule self. Prezenta autoanticorpilor este, uneori, un indiciu al riscului pentru viitoare maladii autoimune, iar alteori, titrul lor seric este o reflectare directa a amplitudinii dezordinii autoimune. Evidentierea autoanticorpilor nu este niciodata revelatoare pentru diagnosticul unei maladii, deoarece se pot gasi si în serul organismului normal. Prezenta lor în serul normal are o frecventa variabila în functie de vârsta si sex: cea mai mica frecventa, autoanticorpii o au în serul barbatilor tineri, iar în serul femeilor vârstnice, frecventa este cea mai mare.

Autoanticorpii se identifica prin tehnicile de *aglutinare pasiva si precipitare*. Tehnicile de aglutinare utilizeaza particule de latex sau eritrocite, tapetate cu antigenul molecular.

Autoanticorpii antitiroidieni se detecteaza prin hemaglutinarea pasiva (HAI), adica antigenul tiroidian este legat pe suprafata eritrocitelor, iar aglutinarea particulelor de latex tapetate cu imunoglobulina este cea mai folosita pentru detectarea factorului

reumatoid. Imunofluorescenta indirecta este folosita pentru evidentierea anticorpilor antinucleari.

Nu toti pacientii cu o anumita dezordine endocrina sintetizeaza autoanticorpi. Testul negativ al detectarii autoanticorpilor nu exclude maladia autoimuna, iar testul pozitiv nu are semnificatia obligatorie a unui diagnostic pozitiv. Autoanticorpii fata de celulele insulare pancreatice au o particularitate ce consta în faptul ca procentajul serurilor pozitive scade dupa declansarea bolii.

Maladii autoimune ale tesutului conjunctiv (colagenoze)

Cele mai frecvente colagenoze sunt *lupusul eritematos diseminat* (LED), *artrita reumatoida* (AR) si *febra reumatismala*. Din punct de vedere imunologic, toate se caracterizeaza prin prezenta autoanticorpilor în ser, care formeaza complexe imune cu diferite antigene tisulare. In febra reumatismala, autoanticorpii lezeaza tesutul miocardic si articulatiile. In artrita reumatoida sunt lezate articulatiile, iar în LED sunt afectate mai multe organe.

Lupusul eritematos diseminat

Denumirea de *lupus* semnifica efectul distructiv asupra tesuturilor, iar calificativul *sistemic* reflecta implicarea unui numar mare de tesuturi, ceea ce confera caracterul generalizat al maladiei; termenul *eritematos* desemneaza eritemul tegumentar care însoteste fazele acute ale maladiei. Lupusul eritematos diseminat este prototipul maladiilor autoimune sistemice. Maladia poate sa apara la orice vârsta, dar femeile în perioada sarcinii sunt cele mai afectate.

Lupusul este asociat cu multiple fenomene autoimune si se exteriorizeaza prin manifestari clinice plurifocale extrem de diverse, care implica sisteme de organe: tegument, articulatii, rinichi.

Din punct de vedere citologic, LED se caracterizeaza prin prezenta celulelor LE (lupice), evidentiate de Hargreaves în maduva osoasa a pacientilor. Celula LE este un PMN care a ingerat nucleul altei celule si poate sa apara în sângele periferic.

Semnul distinctiv al maladiei este nivelul seric ridicat al IgG cu specificitate anti-nucleara. Manifestarile clinice heterogene par a fi asociate cu producerea autoanticorpilor. In serul pacientilor s-au identificat peste 28 de specificitati diferite de autoanticorpi. Cei mai

semnificativi sunt anticorpii antinucleari (FAN), anti-leucocitari, anti-muschi neted de stomac, anti-eritrocitari, anti-plachetari, anti-ribosomali. Titrul crescut de anticorpi anti-ADN dublu catenar, asociat cu nivelul scazut al complementului poate fi considerat ca un test de diagnosticare a LED.

În sângele pacientilor cu LED, exista ADN liber, anticorpi anti-ADN, dar si complexe imune anticorpi-ADN. ADN pur nu este imunogen, dar proteinele cu care este asociat îi confera imunogenitate. In complexul ADN-proteine, ADN are rol de haptena, iar anticorpii au specificitate fata de ADN. Anticorpii anti-ADN apartin clasei IgG si dau reactii încrucisate multiple: cu polizaharidele bacteriene, cu proteinele fibrilare ale citoscheletului, cu cardiolipina. Anticorpii anti-ADN formeaza complexe imune cu ADN circulant si se depoziteaza în tesuturi, având astfel *efecte patologice directe*. Anticorpii lupici se leaga de componente renale (membrana bazala a glomerulilor), fixeaza complementul si initiaza un raspuns inflamator, care modifica functia renala, producând *glomerulonefrita cu complexe imune*, a carei consecinta este *proteinuria*. Complexele imune pot produce si alte manifestari patologice: artrita, vasculita, eruptie rash. O fractie a autoanticorpilor este orientata fata de determinantii suprafetei eritrocitare si pot produce anemia hemolitica, trombocitopenia(liza plachetelor) sau chiar leziuni ale SNC.

Complexele imune se depun, în special la nivelul peretilor vasculari sau sunt filtrate la nivelul glomerulilor renali, unde produc leziuni inflamatorii caracteristice. ADN liber, precum si complexele ADN-anticorpi au afinitate pentru colagenul din membrana bazala a glomerulilor, ceea ce explica depozitarea preferentiala a complexelor imune în rinichiul pacientilor cu LED. Depunerea preferentiala a complexelor ADN-anti-ADN are o explicatie moleculara: histonele din complexele nucleoproteice au afinitate fata de *heparan-sulfat*, component al membranei bazale a glomerulului.

Complexele imune activeaza cascada complementara si cantitatea serica de C3 si C4 diminua la majoritatea pacientilor cu LED activ. Din cauza cresterii ratei sintezei, nivelul seric al acestor proteine poate fi normal, în ciuda consumului accelerat. Anafilatoxinele eliberate din activarea complementului, initiaza reactia inflamatorie locala.

Datorita sintezei autoanticorpilor cu specificitati multiple, maladia este însotita de hipergamaglobulinemie.

Dintre toate specificitatile de autoanticorpi care se sintetizeaza în LED, FAN este cel mai caracteristic si este dominant cantitativ. Anticorpii antinucleari sunt specifici pentru aceasta maladie si detectarea lor este utila pentru diagnostic. Anticorpii anti-nucleari

reactioneaza cu toate tipurile de nuclei, indiferent de origine, dar reactioneaza si cu antigenele nucleare ale gazdei si de aceea sunt considerati autoanticorpi. In LED, titrul anticorpilor antinucleari este crescut, dar anticorpi anti-ADN se sintetizeaza si în artrita reumatoida, în sindromul Sjogren, myasthenia gravis, hepatita cronica activa. Anticorpii antinucleari sunt antinucleosomali (structuri ce constau din ADN si histone). ADN poate fi de origine eucariota sau procariota, dublu catenar sau monocatenar, polidispers sau omogen. Anticorpii se fixeaza pe nucleul unei largi varietati de tesuturi animale, ceea ce permite evidentierea lor în serul pacientilor prin metoda *imunofluorescentei indirecte*. Metoda utilizeaza timus de vitel, dar în special sectiuni de ficat de sobolan, obtinute prin criotomie. Sectiunile se acopera cu serul de cercetat. Lama cu sectiuni se spala pentru îndepartarea anticorpilor care nu au reactionat specific cu nucleul hepatocitului. Lamele se incuba cu ser de iepure anti-IgG umana, conjugat cu fluoresceina. Sectiunile se examineaza la microscop, cu lumina ultravioleta. Daca în serul de cercetat se gaseste FAN, se observa fluorescenta celulelor hepatice de sobolan.

Multi pacienti cu LED au anticorpi serici, nu numai fata de antigenele nucleare, ci si fata de antigenele citoplasmatice.

Cel mai comun fenomen patologic la pacientii cu LED este *vasculita inflamatorie*, datorata depunerii locale a complexelor imune, îndeosebi a acelora care contin ADN, în peretii vasculari.

Maladia se reproduce experimental la soarece prin injectarea unei endotoxine care determina liza celulara, cu eliberare de ADN. ADN liber sau complexele ADN-anticorpi se fixeaza pe membrana bazala.

Agentul declansator al LED nu se cunoaste. Retravirusurile sunt posibili agenti etiologici, deoarece la pacientii cu LED este indusa sinteza unui interferon atipic (IFN-lentivirus), iar în culturile de limfocite de la pacientii cu LED s-a evidentiat revers-transcriptaza.

Predominanta neta a pacientelor (9:1) fata de barbati sugereaza rolul hormonilor sexuali în aceasta maladie. Numeroase date sugereaza un dezechilibru al raportului cantitativ al hormonilor androgeni si estrogeni în plasma. Barbatii cu LED manifesta o prevalenta superioara a hipo-androgenismului. Boala pare sa implice emergenta si activarea limfocitelor TCD_4 si B cu potential autoreactiv.

Declansarea si progresia LED are o baza genetica complexa, cu contributia genelor CMH si a multor gene din afara complexului. Complexitatea genetica în bolile poligenice se datoreaza penetrantei scazute a fiecarei gene în parte, adica este o mica probabilitate ca o anumita alela sa determine expresia maladiei. Datorita penetrantei incomplete, chiar în prezenta unui set complet de alele susceptibile,

maladia nu se manifesta totdeauna.

Artrita reumatoida

Artrita reumatoida este o maladie inflamatorie cronica ce afecteaza predominant membrele superioare si inferioare, dar poate sa implice orice articulatie. Este o maladie autoimuna cronica, sistemica, cu etiopatogeneza necunoscuta. Debutul ei este, de regula, dupa 40 de ani, dar poate sa apara la orice vârsta. Maladia este mult mai frecventa decât LED si este consecutiva persistentei complexelor imune în circulatie, pentru perioade lungi de timp. Este una din cele mai comune maladii autoimune, de 2-3 ori mai frecventa la femei decât la barbati. Artrita reumatoida este caracterizata prin inflamatia si distrugerea cartilajului articular, producând deformarea degetelor.

Waaler si Rose au evidentiat ca serul pacientilor de AR aglutineaza eritrocitele de berbec, tapetate cu o doza subaglutinanta de anticorpi specifici. Concluzia lor a fost ca serul contine un factor specific, care recunoaste regiunea Fc a moleculelor de anticorpi ce tapeteaza hematiile si l-au denumit *factor reumatoid* (FR).

Factorul reumatoid aglutineaza hematiile oricarei specii, daca sunt tapetate cu anticorpi specifici. Factorul reumatoid este autoanticorp, un IgM anti-regiunea Fc a IgG denaturat. *In vitro*, FR precipita cu IgG denaturata chimic sau termic.

In vivo, modificarea structurii IgG se produce dupa ce IgG reactioneaza cu antigenul corespunzator, sau *in vitro*, dupa ce se fixeaza nespecific pe un suport inert sau dupa denaturare termica.

Factorul reumatoid se sintetizeaza fata de molecula IgG a carei conformatie moleculara a fost modificata *in vivo* si se gaseste la circa 70% dintre pacientii cu artrita reumatoida. Dupa modificarea conformatiei moleculare, IgG expune determinanti antigenici inaccesibili pe molecula intacta. Sinteza FR se face în plasmocitele din ganglionii limfatici, dar si în cele din *tesutul de granulatie* al membranei sinoviale. Tesutul de granulatie este un tesut conjunctiv reparator care se formeaza în focarul reactiei inflamatorii.

Determinantii antigenici ai IgG umana, care reactioneaza cu FR, nu se gasesc la toti indivizii. Factorul reumatoid care reactioneaza cu IgG de iepure, este diferit de cel care reactioneaza cu IgG umana. Factorul reumatoid este considerat ca *autoanticorp*, dar nici un FR din aceasta categorie nu se poate numi autoanticorp, din urmatoarele motive:

– nu precipita cu IgG nativa a propriului organism. O varianta a FR se combina cu IgG numai de origine umana si numai daca este legat în

complexe imune, dar nu reactioneaza cu IgG libera;

– factorul reumatoid care se combina cu IgG umana, frecvent recunoaste numai IgG denaturat si agregat prin tratament termic;

– factorul reumatoid precipita IgG cu specificitate alotipica, diferita de aceea a pacientului

– factorul reumatoid precipita cu IgG de alte specii.

Pe baza reactiei cu FR, indivizii umani se împart în doua grupe:

– cei al caror IgG precipita cu FR

– cei al caror IgG nu reactioneaza cu FR.

Determinantii antigenici ai moleculelor de IgG sunt omologi antigenelor de grup sanguin si se numesc *Gm*(gama marker). Ei reprezinta variante antigenice alotipice ale IgG umane. Indivizii al caror IgG reactioneaza cu FR apartin grupului *Gm(a^+),* iar ceilalti sunt *Gm(a^-).*

Biologia moleculara a artritei reumatoide

Mecanismul declansator al maladiei este incert. Nu se cunoaste natura stimulului antigenic. Reactia autoimuna ar fi declansata de o *infectie cu micoplasme* sau cu un *virus* (EBV, CMV sau un retravirus) care ar avea epitopi asemanatori cu autoantigenele. Antigenele de *Salmonella, Shigella* sau *Yersinia* pot sa activeze diferite artrite. Raspunsul fata de aceste antigene este detectat la situsul sinovial al inflamatiei, fara ca microorganismul sa fie prezent. Antigenele bacteriene cu potential autoimun pot fi transportate în articulatii si initiaza sau amplifica un raspuns imun anormal. Printre posibilii factori etiologici ai AR, o atentie speciala s-a acordat *proteinelor de raspuns la socul termic*. Alti autori considera ca un *autoantigen* (gp 39, componenta a tesutului articular) este recunoscut ca nonself de sistemul imunitar. S-a sugerat posibilitatea ca AR sa se datoreze unei *insuficiente corticosteroidiene*, odata cu descoperirea efectelor antiinflamatorii ample ale cortizonului, în aceasta maladie. Ipoteza n-a fost confirmata, dar nici infirmata.

Dupa altii, maladia este declansata de *complexele imune circulante* care se fixeaza în articulatii. Complexele imune sunt recunoscute specific de limfocitele B, care leaga antigenul din complex, prin receptorul imunglobulinic.

Artrita reumatoida este o colectie de maladii autoimune, pentru care antigenul declansator difera, la diferite forme ale maladiei. Desi AR este considerata o maladie autoimuna, tabloul patologic distinctiv este dominat net de o reactie inflamatorie intensa, severa si cronica, stimulata de antigene infectioase sau de superantigene.

Etiologic, AR pare a fi rezultatul unei combinatii de factori care include predispozitia genetica si stimularea antigenica, posibil ca rezultat al infectiei cu microorganisme. Procesul imunologic are un rol central în patogeneza AR, argumentat de urmatoarele observatii:

- prezenta autoanticorpilor serici (FR)
- în situsul inflamator se gasesc factorii rezultati din activarea C
- în situsul articular inflamat se gasesc neutrofile, limfocite T, B, macrofage si citochinele lor
- sensibilitatea la AR este asociata cu expresia unor alele specifice CMH II.

Limfocitele T sunt implicate direct în mecanismul patogeniei AR. In tesutul sinovial reumatoid, celulele care delimiteaza cavitatea sinoviala sunt hiperplazice si sunt infiltrate cu limfocite B, T si macrofage. Utilizarea AMC marcati cu fluoresceina, arata ca în tesuturile sinoviale sunt celule T care exprima molecule CMH II.

Oricare ar fi stimulul, la nivelul articulatiei se declanseaza *reactia inflamatorie*, proces patologic care determina progresia AR. Se presupune ca celulele Th_1 recunosc un antigen self în tesutul sinovial, se activeaza si produc limfochine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ) si activeaza limfocitele B, care se diferentiaza în plasmocite si secreta IgG, ce formeaza complexe imune (CI). CI activeaza cascada C si se elibereaza C3a si C5a, cu actiune chimiotactic pozitiva si activatoare fata de leucocite, inclusiv pentru limfocite, care amplifica reactia inflamatorie. Celulele Th_1 secreta citochine care activeaza celulele fagocitare ce elibereaza produse de oxidare a acidului arachidonic, radicalii oxigenului si metaloproteaze lizosomale, care degradeaza matricea extracelulara a tesutului articular.

Macrofagele elibereaza IL-1, cu efecte multiple: stimuleaza proliferarea si eliberarea moleculelor proteolitice si chimiotactice din macrofage, stimuleaza osteoclastele si condroclastele. Osteoclastele si condroclastele ataca si lizeaza cartilajul, amplificând inflamatia articulara. Factorii de crestere si citochinele stimuleaza hiperplazia fibroblastelor si angiogeneza în jurul articulatiei, iar în membrana sinoviala a articulatiei se organizeaza foliculi limfoizi, cu centri germinativi în care se gasesc numeroase plasmocite. Raspunsul imun si raspunsul inflamator initiaza si întretin o sinovita, care poate progresa la forma eroziva a artritei, la pacientii pozitivi pentru epitopul antigenic declansator sau datorita contactului repetat cu un epitop de origine infectioasa, stimulator al reactivitatii imunitare si al reactiei inflamatorii.

Trasatura esentiala a patologiei AR este *degradarea cartilajului articular*, sub actiunea *metaloproteazelor* derivate din celulele inflamatorii infiltrate si din condrocitele rezidente: colagenaze,

gelatinaze, stromelizine etc. Sinteza lor este stimulata de citochinele inflamatorii. Cartilajul articular este un tesut unic pentru ca celulele sale componente se gasesc în lacune izolate, fara contact direct cu alte celule. Cartilajul este nevascularizat si este foarte rezistent la invazia cu vasele sanguine si de catre celulele tumorale.

Molecule din categoria FR se sintetizeaza si la persoane cu dezordini limfoproliferative. Factorii reumatoizi de la persoanele normale sunt componente ale familiei anticorpilor naturali, cu afinitate mica fata de self. Adeseori, anticorpii naturali sunt polispecifici, reactionând cu antigene self si cu antigene exogene. In contrast, factorii reumatoizi de la pacientii cu artrita reumatoida au adeseori afinitate înalta.

Artrita reumatoida se reproduce experimental prin injectarea *fibrinei* heterologe. Se produce o hiperplazie a celulelor membranei sinoviale, eroziunea cartilajului articular si a osului subiacent si inflamatia cronica a membranei sinoviale.

Alt model experimental al artritei este *artrita de adjuvant*. Prin injectarea intradermica a antigenului, asociat cu adjuvantul Freund complet, la sobolan se dezvolta o afectiune similara artritei reumatoide.

Febra reumatismala sau reumatismul articular acut (RAA) .

Febra reumatica este o complicatie relativ rara a faringitei streptococice, ce apare la 2-4 saptamâni dupa infectia bacteriana. Febra reumatismala este o afectiune provocata de *complexele imune circulante*, care se localizeaza în regiunile articulare. Se manifesta ca o poliartrita febrila, cu evolutie favorabila, singurul risc fiind complicatiile valvulare cardiace, miocardice sau pericardice. Febra reumatismala este consecutiva infectiei tractului respirator cu *Str. haemolyticus*. Dupa 2-3 saptamâni, se dezvolta o maladie asemanatoare maladiei serului, cu febra, artrita, uneori chorea si cardita. Anticorpii cu reactie încrucisata ataca valvele cardiace, pentru ca antigenele self ale tesutului cardiac se aseamana cu proteina M din *Str. haemolyticus*. Riscul complicatiilor cardiace este mai mare pentru indivizii cu grup sanguin A. Toate grupele sanguine au un precursor antigenic comun – *antigenul H* (codificat de gena H) – pe suprafata eritrocitelor, bine exprimat cantitativ la persoanele de grup 0. Specificitatea antigenica a hematiilor de *grup 0* este conferita de *L-fucoza. Grupul A* are are o alta gena ce codifica sinteza glicozil-transferazei, enzima ce adauga N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminala a substantei H. De aceea, specificitatea antigenica a eritrocitelor *grupului A* este data de *N-acetil-D-galactozamina si L-fucoza*.

Indivizii *grupului B* au o gena ce adauga D-galactoza la galactoza preterminala a moleculei H si specificitatea antigenica a eritrocitelor este data de *D-galactoza si L-fucoza*.

Glucidul terminal al polizaharidului streptococic este N-acetil-D glucozamina, legata de un polimer de ramnoza. Diferenta dintre N-acetil-D glucozamina si N-acetil-D galactozamina este grupul OH. De aceea, antigenele de grup sanguin A se aseamana cu antigenul streptococic, mai mult decât ale grupului 0. La fel pentru antigenele de grup B, la care D-glucoza este mai asemanatoare structural cu N-acetil-D glucozamina de *Str. pyogenes*, decât cu L-fucoza grupului 0. Ca urmare, anticorpii produsi de indivizii de grup A, dupa infectia cu *Str. pyogenes*, se cupleaza cu antigenele tisulare care contin antigene ale grupului A si produc reactii inflamatorii. Tesutul cardiac contine grupe moleculare, similare cu substanta de grup A.

Anticorpii anti-streptococici se leaga cu antigenele înrudite (o reactie încrucisata), ceea ce explica frecventa superioara a febrei reumatice la indivizii cu grup sanguin A si B, fata de indivizii cu grup sanguin 0.

Chorea care însoteste febra reumatica, se poate explica prin asemanarea unor molecule ale ganglionilor bazali, cu antigene streptococice.

Febra reumatismala debuteaza în momentul în care încep sa se sintetizeze anticorpi antistreptococici. Absorbtia antigenelor streptococice în circulatia sanguina, determina, în special, sinteza anticorpilor anti-streptolizina O (ASLO). Se formeaza complexe imune circulante. Ramâne neexplicat faptul ca numai 2-3% dintre indivizii atinsi de infectia cu *S. pyogenes* fac reumatism articular acut.

Tesutul cardiac este adeseori implicat, deoarece anticorpii dau reactie încrucisata cu antigenele streptococice si cu antigenele de organ ale fibrei musculare striate din muschiul cardiac si chiar cu muschiul neted din peretii vasculari. Anticorpii anti-streptolizina O reactioneaza cu sarcolema fibrelor musculare cardiace. O fractie a anticorpilor anti-streptococici, reactioneaza încrucisat atât cu antigenele glucidice bacteriene, cât si cu o proteina structurala de pe valvele cardiace. Complicatiile pericardice, uneori consecutive infectiei cu *S. pyogenes*, nu sunt explicate, pentru ca în pericard nu se gasesc antigene care sa reactioneze încrucisat cu cele bacteriene.

Biologia moleculara a maladiilor autoimune organo-specifice

O serie de maladii cu substrat imunitar se caracterizeaza prin spectrul foarte limitat al specificitatii autoanticorpilor serici si implicit prin limitarea leziunilor tisulare la tesutul tinta: tiroidita autoimuna Hashimoto, boala Basedow-Graves, diabetul zaharat insulino-dependent, myasthenia gravis, anemia pernicioasa, boala Addison, insuficienta ovariana primara, pemphigus.

Cel mai adesea, autoanticorpii sunt specifici fata de componente ale sistemului endocrin. Adeseori, în cazuri patologice, în organism se sintetizeaza anticorpi cu specificitate fata de un anumit *receptor hormonal*. Mecanismul inductiei sintezei acestor anticorpi nu se cunoaste, dar se considera ca receptorii de hormoni sunt “secretati” de celule în mediul intern. Moleculele sunt preluate si prelucrate de celulele specializate si sunt prezentate limfocitelor. Anticorpii anti-receptor hormonal pot sa blocheze functia hormonului respectiv.

Autoanticorpii fata de receptorii pentru hormonii hipofizari si fata de receptorii organului tinta au rol determinant în progresia unor maladii. Cei mai studiati sunt anticorpii anti-receptor pentru TSH si anti-receptor de insulina. Efectele fizio-patologice ale anticorpilor anti-receptori hormonali sunt variate. Anticorpii pot stimula activitatea receptorului si efectul este intensificarea activitatii secretorii a glandei (efect mimetic hormonal) sau invers, blocheaza receptorul si efectul se reflecta în inhibitia activitatii secretorii. La acelasi pacient pot coexista ambele variante de anticorpi. De exemplu, anticorpii fata de *receptorul periferic de insulina,* se gasesc la un numar mic de pacienti cu diabetus melitus insulino-rezistent, dar si la cei hipoglicemici. Pacientii cu aceste manifestari au o maladie autoimuna de fond, cel mai adesea lupus eritematos diseminat.

Uneori, pacientii hiperglicemici insulino-rezistenti, evolueaza spre hipoglicemie. S-a presupus ca autoanticorpii cu titru crescut, distrug receptorul de insulina si de aici ar rezulta rezistenta maladiei la hormonul circulant, iar autoanticorpii anti-receptor de insulina, cu titru scazut, produc o stimulare a receptorului (mimeaza actiunea hormonului)si efectul este hipoglicemia. Se pare însa ca autoanticorpii au specificitate fata de epitopi diferiti ai receptorului, ceea ce explica diferentele actiunii lor.

Diabetus mellitus insulino-dependent

Diabetul zaharat este cea mai frecventa maladie endocrina.

Diabetus mellitus insulino-dependent (IDDM) rezulta din distrugerea celulelor pancreatice B, producatoare de insulina. Rezultatul este hipoinsulinemia si hiperglicemia. IDDM pare a fi o maladie autoimuna. Predispozitia genetica este o conditie necesara pentru declansarea maladiei, dar factorii de mediu – infectiile virale, regimul alimentar, diferite toxine, au un rol important în expresia clinica a acestei maladii. Maladia s-a reprodus experimental la soarece. Insulele sunt infiltrate cu limfocite. Sunt lizate celulele B ale insulelor, procesul distructiv excluzând alte tipuri celulare, care ramân intacte. Dupa instalarea hiperglicemiei, gradul infiltrarii mononucleare scade. Infiltratul consta din macrofage, celule dendritice, TCD_4, TCD_8, NK si mai putin limfocite B.

În ser se detecteaza anticorpi anti-celule insulare pancreatice, cu specificitate citoplasmatica si anticorpi anti-componente membranare (decarboxilaza acidului glutamic). Aceasta enzima se gaseste în citoplasma celulelor B pancreatice, dar functia ei este necunoscuta. Aceiasi enzima se gaseste în neuronii care produc inhibitorul transmiterii impulsului nervos – acidul γ-aminobutiric. La epileptici, ca si la pacientii IDDM, titrul anticorpilor anti-glutamic acid-decarboxilaza este crescut. Enzima citoplasmatica se gaseste si la nivelul membranei plasmatice, unde devine tinta sistemului imunitar si induce sinteza autoanticorpilor. Agentul etiologic al IDDM nu este cunoscut, dar poate fi un picornavirus (Coxsackie B_4) litic pentru celulele B insulare, ale carui antigene dau reactie încrucisata cu antigene self. Diferite substante toxice cu efect litic ar elibera antigenele celulare. Celulele B insulare pot fi lizate direct, sub actiunea infectiei virale sau de catre macrofage, care detecteaza antigenele virale. Agentii chimici diabetogeni (aloxan, streptozocina etc.) distrug celulele B prin diferite mecanisme si reproduc maladia, cu sinteza auto-anticorpilor anti-celule insulare.

Maladii autoimune tiroidiene

Tiroida secreta tiroxina (T_4) si triiodotironina (T_3), hormoni reglatori ai ratei metabolismului bazal si ai functiilor cardiace si neurologice. Afectiunile tiroidei pot determina modificari ale secretiei hormonale, hipertrofia glandei sau ambele consecinte.

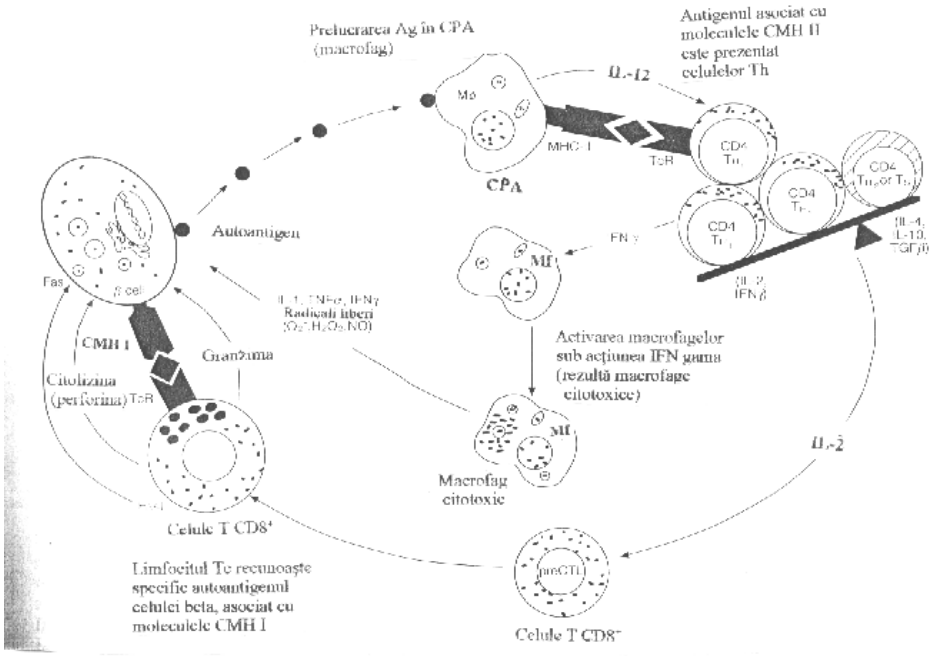


Fig. 129. Reprezentare schematica a dezvoltarii *diabetului zaharat insulino-dependent* (IDDM). Autoantigenele eliberate din celulele β în timpul turnover-ului natural sau lizei celulelor datorita infectiei virale, sunt prelucrate de macrofage si prezentate celulelor Th în asociatie cu moleculele CMH II. Macrofagele elibereaza IL-12, activatoare a limfocitelor Th1. În acelasi timp, IL-2 si alte citochine eliberate de celulele CD_4^+, activeaza limfocitele T cu potential toxic fata de celulele insulare β. IFN γ eliberat de celulele Th stimuleaza functia citotoxica a macrofagelor. Ele elibereaza citochine cu efect toxic pentru celulele β (IL-1 β, TNF α, IFN γ) si radicali liberi. Celulele Th secreta interleuchine care activeaza alte celule Th, limfocite B si celule Tc. Celulele Tc (CD_8^+) pot sa recunoasca autoantigenele exprimate pe celulele β normale. Ele elibereaza granzima si citolizina (perforina), cu efect toxic asupra celulelor β insulare. Distrugerea celulelor β ar putea fi datorata apoptozei mediata de interactiunea receptorului Fas cu ligandul Fas. Astfel, macrofagele, celulele T si citochinele coopereaza sinergic pentru distrugerea celulelor β, rezultatul fiind diabetul zaharat insulino-dependent (dupa Ji-Woon Yoon, 1998).

În ariile geografice în care ingestia iodului alimentar este adecvata necesitatilor, maladiile tiroidiene au, în primul rând, mecanisme imunitare. Ele apar cu o fecventa de circa 4% în populatia umana si se manifesta prin *hipertiroidism* cu sau fara *oftalmopatie* sau prin *hipotiroidism.* În ambele cazuri, tiroida poate sa creasca în volum (gusa).

S-au descris trei specificitati de autoanticorpi anti-tiroidieni: *anti-tiroid peroxidaza* (antigenul microsomal); *anti-tiroglobulina; anti-receptor pentru TSH* al celulelor acinare tiroidiene.

Hipertiroidismul cu cresterea volumului glandei este cunoscut sub denumirea de boala Graves sau von Basedow sau boala Parry, iar insuficienta *tiroidiana* poarta numele de *tiroidita autoimuna,* caracterizata prin infiltrare limfocitara. În functie de aspectul clinic, se disting doua stari patologice: *tiroidita Hashimoto* (gusogena) si *tiroidita atrofica* (mixedem primar). În ambele cazuri, tesutul tiroidian se distruge.

Boala tiroidiana autoimuna apare în special la organisme feminine si din punct de vedere imunologic se caracterizeaza prin autoanticorpi circulanti, celule T activate fata de antigenele tiroidiene si prin infiltrarea limfocitara a organului.

Maladia Basedow-Graves (tirotoxicoza) este de natura autoimuna si se caracterizeaza prin sinteza anticorpilor (IgG) anti-tiroidieni, detectabili la 85% dintre pacienti, iar histologic se observa leziuni structurale. Anticorpii anti-tiroidieni sunt autoanticorpi specifici fata de *receptorul pentru TSH*. Anticorpii se fixeaza pe receptorul celular pentru TSH si efectul este o stimulare de durata a functiei tiroidei. Autoanticorpii s-au denumit LATS (*L*ong-*A*cting-*T*hyroid-*S*timulating). Mecanismul lor de actiune este acelasi ca si al TSH, prin intermediul adenil-ciclazei.

Interactiunea autoanticorpilor cu antigenul celular (receptorul pentru TSH) nu produce distrugerea celulei, ci efectul este proliferarea si stimularea activitatii ei. Un efect stimulator asemanator îl are IgG anti-imunoglobulina de suprafata a limfocitului B. Rezultatul este transformarea blastica a limfocitului.

Actiunea anticorpilor anti-TSH nu se supune controlului feed-back prin hormonul tiroidian, a carui sinteza este stimulata. Tiroida se activeaza, secreta hormon tiroidian si creste mult în volum. Celulele foliculare se divid si hiperplazia tiroidei este asociata cu hiperfunctia.

Autoanticorpii anti-receptor pentru TSH traverseaza placenta si determina hiperplazia tiroidiana a fatului, cu manifestarile clinice ale hipertiroidismului, ce persista pâna când anticorpii de origine materna sunt catabolizati.

Maladia este influentata de diferiti factori: vârsta, sex, rasa, starea hormonala. Maladia se remite în timpul sarcinii, dar se activeaza la modificari hormonale: pubertate, perioada post-partum, menopauza. Boala este mai grava la barbati (desi ei sunt numai 25% dintre pacienti), cu titru mare de anticorpi.

Oftalmopatia se datoreaza hipertrofiei musculare extraoculare, cresterii volumului tesutului adipos si a tesutului conjunctiv înconjurator,

cu infiltrat celular inflamator si al celulelor imunitare. Se pare ca anticorpii si limfocitele T recunosc determinanti antigenici pe muschii extraoculari sau pe fibroblastele orbitale, cu fenomene de citotoxicitate mediata celular, dependenta sau independenta de anticorpi.

Tiroidita Hashimoto. La pacientii cu maladia autoimuna a tiroiditei Hashimoto, se gasesc autoanticorpi cu diferite specificitati, dar definitorie pentru aceasta maladie este înlocuirea tesutului tiroidian, cu tesut limfoid. Volumul glandei creste foarte mult, dar nu, sintetizeaza hormoni (gusa uscata). In serul pacientilor se gasesc autoanticorpi care reactioneaza cu tiroglobulina, anticorpi anti-celule tiroidiene, anticorpi anti-TSH si anticorpi fata de antigenele microsomale asociate cu lipoproteinele. Microsomii sunt constituienti intracelulari ai veziculei de exocitoza a celulei tiroidiene, în care se matureaza hormonul tiroidian. Veziculele de exocitoza transporta tiroglobulina spre suprafata apicala a celulei si o elibereaza prin fuziunea cu membrana polului apical. Microsomii tiroidieni se exprima si pe membrana laterobazala a celulei, când vezicula de exocitoza fuzioneaza gresit cu aceasta zona. Astfel, hormonul devine accesibil sistemului imunitar. Microsomii constituie autoantigenul, potential stimulator al raspunsului imun.

Anticorpii anti-microsomi tiroidieni au facut posibila detectarea unei proteine de 993 aminoacizi – *tiroid-peroxidaza* (TPO), enzima tiroidiana asociata microsomilor, cu rol esential în generarea hormonilor tiroidieni din tiroglobulina.

Anticorpii anti-tiroglobulina au titru de pâna la 1/2500 si se detecteaza în reactia de precipitare dintre serul pacientilor si mojaratul de tesut tiroidian.

In vivo, autoanticorpii se fixeaza pe tesutul tiroidian. Se produce inflamatia cronica a tiroidei si cresterea volumului ei (gusa). Se disting doua situatii patologice: tiroidita gusogena si tiroidita atrofica (mixedem primar).

În ambele cazuri, celulele foliculare tiroidiene se lizeaza. Consecinta este deficitul tiroidian (*hipotiroidia*), proportional cu volumul tisular pierdut. Hipotiroidismul este asociat cu mixedemul primar. In serul pacientilor se gasesc anticorpi anti-receptor pentru TSH, care blocheaza legarea TSH, fiind astfel inhibata regenerarea foliculilor, o trasatura a gusii Hashimoto, dar si anticorpi anti-muschi neted de stomac, anticorpi anti-factor intrinsec. Rolul autoanticorpilor în distrugerea celulelor tiroidiene nu este determinat, iar maladia este, în primul rând, rezultatul actiunii limfocitelor T care infiltreaza tesutul glandular.

Maladia se induce experimental prin injectarea mojaratului de tesut tiroidian omolog sau heterolog, la iepure, asociat cu adjuvantul

Freund. Tiroida se infiltreaza cu limfocite mici. Liza tesutului tiroidian este rezultatul imunitatii mediate celular, fata de antigenele tiroidiene.

Autoanticorpii fata de antigene ale membranei se sintetizeaza în diferite *neuropatii*. Sunt cunoscuti anticorpii specifici fata de *gangliozidele* celulei nervoase. Aceste molecule alcatuite dintr-un lipid, ceramida (sfingozina legata de un acid gras), combinate cu o varietate de oligozaharide, se gasesc în membrana neuronilor periferici. In serul pacientilor cu diferite neuropatii se gaseste IgM specific fata de o anumita gangliozida. Anticorpii nu initiaza procesul patologic si nu au specificitate de maladie, ci se sintetizeaza dupa leziuni ale tesutului nervos (dupa atacul cerebral, dupa traumatisme ale cutiei craniene sau chiar la pacientii cu spondiloza cervicala).

Anemia pernicioasa

Anemia pernicioasa apare în stadiile terminale ale gastritei autoimune distructive si este consecinta distrugerii celulelor parietale ale glandelor gastrice, datorita conflictului imunitar. In absenta celulelor parietale, vitamina B_{12} nu se absoarbe.

Denumirea “pernicioasa”, data de Biermer (1972), subliniaza progresia inevitabila spre fatalitate si s-a pastrat, desi ea este caracteristica numai pentru faza terminala a bolii.

De fapt, maladia debuteaza si se manifesta ca o *gastrita autoimuna*, pentru care exista dovezi histologice din 1970, dar conditionarea dintre anemie si gastrita a fost precizata de Biermer.

Procesul patologic autoimun este initiat la nivelul mucoasei gastrice si este de lunga durata (circa 20 de ani), cu mult înaintea epuizarii functionale a celulelor parietale. În serul pacientilor se gasesc autoanticorpi cu mai multe specificitati, dar cei *anti-stomac* au titrul cel mai înalt. Sediul sintezei lor este în plasmocitele din mucoasa gastrica si se leaga specific fata de doua categorii de auto-antigene:

– *ATP-aza* H^+K^+ (o enzima) din celula parietala, cu specificitate celulara, dar nu de specie, ceea ce denota importanta rolului fiziologic al moleculei în celula parietala gastrica;

– un produs de secretie a celulelor gastrice parietale, denumit *factor gastric intrinsec* sau *transcobalamina*, o glicoproteina a carei functie este de a lega vitamina B_{12} si de a permite absorbtia ei intestinala.

Enzima ATP-aza H^+K^+ functioneaza ca pompa protonica si realizeaza acidifierea sucului gastric. Ea apartine familiei ATP-azelor de tip P, cu rol în fluxul ionic (Na^+K^+-ATP-aza, Ca^{2+}-ATP-aza). Anticorpii anti-factor intrinsec au o frecventa de 80-90%, în cazurile clinice de

anemie pernicioasa si se evidentiaza prin inhibitia fixarii vitaminei B_{12} radiomarcate, în sucul gastric. Enzima gastrica ATP-aza H^+K^+ este localizata pe membranele intracelulare si pe membrana apicala a celulei gastrice parietale.

Factorul gastric intrinsec este o glicoproteina de 44 kD. Vitamina B_{12}, în mediul acid al sucului gastric, se elibereaza din legaturile sale cu proteinele si se leaga cu transcobalamina. Daca secretia acida este inhibata de inactivitatea H^+K^+-ATP-azei, cantitatea de vitamina B_{12} disponibila pentru a se lega cu factorul intrinsec diminua mult, iar situsul de legare cu transcobalamina este blocat de autoanticorpi. Rezultatul este malabsorbtia vitaminei B_{12}. Gastrita autoimuna progreseaza pâna când vitamina B_{12} scade la nivele ce nu mai pot sa sustina metabolismul neuronal. Pacientul devine anemic, cu complicatii neurologice.

Anticorpii sunt IgG si alaturi de limfocitele T, participa la distrugerea celulelor gastrice. Pe masura ce inflamatia progreseaza, se reduce numarul celulelor principale si al celor parietale. Reactia autoimuna este limitata la corpul stomacului. Rezultatul este atrofia gastrica, dar rata progresiei este variabila. La unii indivizi, capacitatea de a absorbi vitamina B_{12} se mentine timp de circa 20 de ani, iar la altii atrofia este rapida si se instaleaza anemia pernicioasa.

Myasthenia gravis

Myasthenia gravis se caracterizeaza clinic prin diminuarea progresiva a fortei muschilor scheletici, cu atingerea musculaturii oculare, a membrelor, a trunchiului si, în cazuri severe, a muschilor respiratori.

Maladia este asociata cu sinteza anticorpilor *anti-receptor de acetilcolina* (Ach), prezent pe membrana celulei musculare la nivelul placii motorii, prin intermediul careia neuronul intra în contact cu fibra musculara. Receptorii sunt localizati la vârfurile pliurilor membranei postsinaptice ale fibrelor muschilor striati si sunt proteine alcatuite din trei catene (α, β, γ). Ei leaga acetilcolina eliberata din terminatia nervoasa, în fanta sinaptica. Acetilcolina este eliberata de potentialul presinaptic si ca raspuns, se deschid canalele cationice specifice pentru Na, producându-se depolarizarea locala a membranei postsinaptice si declansarea potentialului de actiune al muschiului. Imunizarea iepurelui cu receptori purificati de Ach din organul electric de peste *Electrophorus*, produce autoanticorpi anti-receptor de Ach si simptome

asemanatoare cu *myasthenia gravis*. Legarea anticorpilor de receptorul de Ach, blocheaza legarea Ach si functia canalelor ionice.

Maladia afecteaza indivizi de la vârsta copilariei, pâna la cei vârstnici.

Leziunile placii motorii pot fi amplificate prin mecanisme dependente de complement. La nivelul placii motorii, numarul receptorilor de acetilcolina diminua semnificativ. Odata cu pierderea receptorilor se instaleaza *oboseala musculara,* trasatura clinica esentiala a maladiei, pentru ca impulsul nervos, chiar daca elibereaza o cantitate normala de acetilcolina, nu este urmat de contractia musculara. Muschiul nu este afectat, iar receptorii de acetilcolina se reînoiesc cu o rata optima. Oboseala musculara se datoreaza scaderii numarului si functiei receptorilor de acetilcolina. Pierderea receptorilor de acetilcolina, diminua sensibilitatea membranei postsinaptice la acetilcolina. Astfel, potentialele electrice produse de eliberarea acetilcolinei din terminatia nervoasa motoare au o frecventa redusa, scade amplitudinea lor si diminua amplitudinea contractiei.

Autoanticorpii fata de receptorii de acetilcolina se detecteaza la 85-90% din pacientii cu *myasthenia gravis* generalizata si la 50-60% dintre cei cu maladia limitata la musculatura oculara. Practic, sunt absenti la persoanele sanatoase.

Eliminarea anticorpilor din sânge este conditia recuperarii. Sinteza anticorpilor poate fi inhibata prin supresia limfocitelor B producatoare de anticorpi. Anticorpii plasmatici pot fi eliminati prin procedeul plasmaferezei.

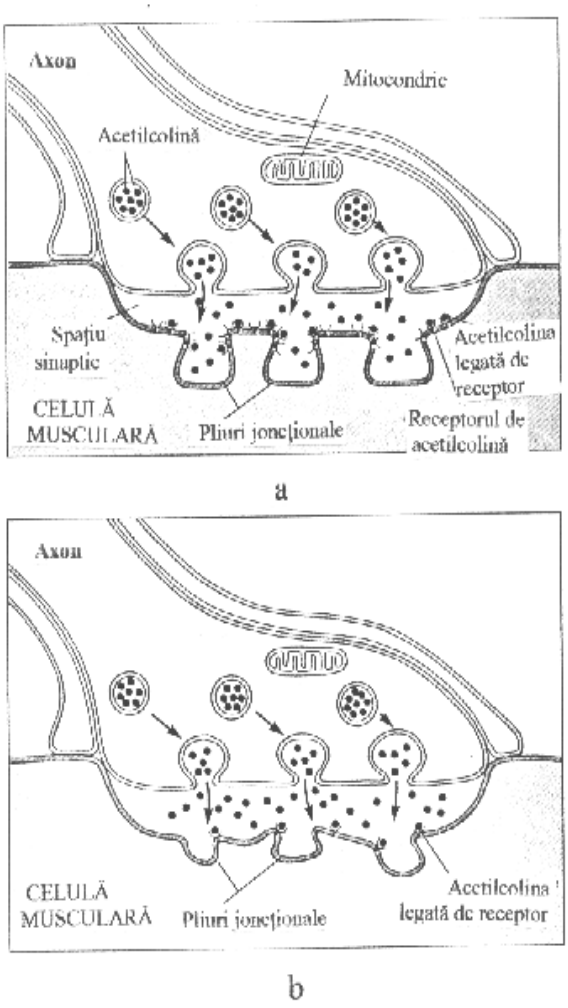


Fig. 130. *Myasthenia gravis* presupune pierderea recepto-rilor de acetilcolina (Ach) de la jonctiunea neuromuscu-lara. **a**. O sinapsa neuro-musculara normala are un numar mare de receptori ce leaga Ach. **b**. Pacientii mias-tenici au un numar semni-ficativ mai mic de receptori de Ach.

Serul de la miastenicii negativi pentru anticorpii anti- receptor de acetilcolina poate sa transfere maladia la animale de experienta, sugerând ca maladia poate fi produsa de anticorpi fata de o alta proteina.

Titrul anticorpilor nu se coreleaza cu severitatea bolii, ceea ce

sugereaza rolul preponderent al altor factori (neimunitari) în evolutia maladiei.

La jonctiunea neuro-musculara, în stadiile de acutizare a simptomatologiei, se gasesc macrofage.

În special la persoanele tinere afectate de *myasthenia gravis*, timusul se mareste, rezultând un *timom* de natura epiteliala, limfoida sau mixta, iar alteori timusul ramâne nemodificat. In 70-80% din cazurile de timom, în timus se formeaza centrii germinativi, ceea ce denota o sinteza locala a anticorpilor. Rareori, timomul este un epiteliom. Efectul favorabil se obtine prin timectomie, ceea ce a stimulat identificarea unui factor timic circulant, susceptibil de a deprima conducerea neuromusculara. Goldstein a izolat, din timusul de vitel, un factor polipeptidic, cu greutatea muculara de 6000 D, pe care l-a denumit *timopoetina*, cu un posibil rol în diferentierea limfocitelor T.

La persoanele vârstnice, timusul este atrofic. La jonctiunea cortico-medulara se gasesc celule mioide, cu receptori de acetilcolina de tip extrasinaptic (embrionar). Maladia poate fi initiata în timus, fata de receptorii de acetilcolina ai acestor celule, iar ulterior se extinde fata de receptorul sinaptic de acetilcolina.

Maladia se reproduce experimental la iepure, prin imunizarea organismului cu receptori de acetilcolina, purificati din organul electric de *Electrophorus.* Forta musculara se reduce, ca si în situatia clinica umana. În serul pacientilor se gasesc autoanticorpi cu alte specificitati: anti-muschi striat, anti-nucleari, anti-muschi neted, anti-celula parietala de stomac.

Ciroza biliara primara

Ciroza biliara primitiva (CBP) fara antigenul HBs este o maladie cronica enigmatica a ficatului, caracterizata prin obliterarea inflamatorie progresiva a ductelor biliare intrahepatice. Limfocitele T se infiltreaza si distrug cele mai mici *ducturi biliare intrahepatice*, rezultatul fiind obstructia biliara progresiva lenta, icter si în final, ciroza. Maladia se detecteaza cu precadere la femei, cu o varietate de autoanticorpi, cu complexe imune circulante si activarea complementului, cu disfunctia celulelor T reglatoare, cu defecte de comutare izotipica a sintezei imunoglobulinelor, cu predominanta celulelor T în infiltratele hepatice periductale.

Autoanticorpii sunt specifici fata de autoantigenele tiroidiene, anti-muschi neted, anticorpi fata de antigenele nucleare. Autoanticorpii anti-tiroidieni sunt citotoxici, dar semnul distinctiv al maladiei este conferit de *anticorpii anti-mitocondriali*, cu titru înalt, la 90% dintre

pacientii cu ciroza. Anticorpii anti-mitocondriali nu au specificitate de organ si nici de specie.

Titrul seric al imunoglobulinelor creste, iar proteinele complementului diminua cantitativ, datorita activarii cascadei. Scade numarul limfocitelor TCD_4 si TCD_8.

La examenul histologic, ductele biliare sunt înconjurate si penetrate de limfocitele T infiltrate, în special CD_8, care formeaza adevarate granuloame, ceea ce este neobisnuit pentru patologia autoimuna. In mod normal, epiteliul ductelor biliare exprima numai molecule CMH I, dar la pacientii CBP, celulele epiteliale biliare exprima si molecule CMH II. Aparitia acestor molecule poate fi relevanta si definitorie pentru ciroza biliara primitiva autoimuna, pentru ca celulele epiteliale ale ductelor biliare pot avea rolul de celule prezentatoare de antigen pentru limfocitele TCD_4.

Autoanticorpii specifici antimitocondriali constituie semnul distinctiv al CBP. Anticorpii recunosc proteine majore ale membranei mitocondriale interne. Proteinele mitocondriale sunt enzime intracelulare, componente ale unor complexe enzimatice mari. Autoanticorpii par a fi orientati fata de situsurile functionale ale enzimelor, deoarece interfera cu functiile lor metabolice. Diagnosticul se bazeaza pe capacitatea serului de la pacientul cu CBP de a *inhiba* activitatea catalitica a complexului enzimatic al *piruvat-dehidrogenazei*.

Mecanismul molecular al etiologiei acestei maladii autoimune nu este înteles. Este posibil ca antigenele unui agent infectios sa dea reactie încrucisata cu autoantigenele mitocondriale. Pe de alta parte, autoantigenele sunt sintetizate în citoplasma si transportate în mitocondrii. Mutatiile în secventa leader sau defecte ale degradarii lor, pot duce la generarea unor molecule noi si la exprimarea lor pe membrana celulei, unde devin tinta reactivitatii imunitare. Autoanticorpii anti-mitocondriali nu au efect patologic. Transplantul ficatului normal la un pacient cu CBP nu este urmat de manifestarile patologice, desi anticorpii antimitocondriali persista.

Sindromul Wiskott-Aldrich este x-lincat si se caracterizeaza prin trombo-citopenie si sângerari. Nivelul IgG este scazut, iar IgA si IgE sunt crescute.

Sterilitatea imuna a barbatilor este caracterizata prin sinteza anticorpilor în lichidul seminal, specifici fata de antigenele spermatozoizilor, care imobilizeaza spermatozoizii, iar la titru înalt, produc chiar aglutinarea lor. Anticorpii se sintetizeaza local, în structurile epididimului, deoarece concentratia lor este mult mai înalta decât în sânge.

Maladia Addison

Maladia Addison survine ca o consecinta a distrugerii tesutului *suprarenalian*, în proportie de 90%. Tesutul poate fi distrus pe cale chirurgicala, datorita tuberculozei renale, histoplasmozei, criptococozei, prin mecanism autoimun sau datorita altor cauze necunoscute (maladia Addison idiopatica).

În maladia Addison autoimuna, tesutul glandular este infiltrat cu limfocite, iar în ser se gasesc autoanticorpi specifici fata de antigene din citoplasma celulelor corticosuprarenalelor, cu specificitate de organ. Autoanticorpii sunt detectabili la circa 80% dintre pacientii cu boala Addison de natura autoimuna.

Tehnica imunofluorescentei evidentiaza ca autoanticorpii reactioneaza cu toate cele trei straturi celulare ale corticosuprarenalei. Serul unor pacienti reactioneaza cu antigene ale celor trei zone corticale, alte seruri reactioneaza cu zona fasciculata si cu zona reticulata si o mica proportie reactioneaza numai cu zona glomerulara, ceea ce sugereaza heterogenitatea bolii Addison, cu implicarea preferentiala a diferitelor antigene ale corticosuprarenalei.

Anticorpii serici dau reactie încrucisata si cu antigenele altor celule care secreta hormoni steroidici: cu celulele trofoblastice ale placentei ce secreta HCG; cu celulele interstitiale testiculare Leydig; cu celulele corpului galben ovarian.

Celulele zonei corticale se distrug, iar acolo unde mai ramân, nu mai pastreaza arhitectura normala a distributiei în cele trei zone corticale. Celulele sunt hipertrofiate si au aspect vacuolar. Tesutul corticosuprarenalian este infiltrat cu macrofage si plasmocite. Zona medulara este intacta sau infiltrata cu un numar mic de celule limfoide.

Boala Crohn si colita ulcerativa

Boala Crohn si colita ulcerativa sunt maladii ulcerative ale *intestinului gros*. Ambele constau dintr-un infiltrat intens al macrofagelor si limfocitelor, cu un numar mare de celule plasmatice. In colita ulcerativa, modificarea patologica consta în inflamatia difuza, cu ulcere ale mucoasei. Este implicata numai mucoasa, fara straturile profunde.

În boala Crohn, infiltratul inflamator formeaza adeseori granuloame si se poate extinde în stratul muscular. Se sintetizeaza predominant IgG. Marimea zonei mucoase infiltrate este diferita. Simptomele principale sunt diareea si hemoragia colica.

Leziunile colice sunt induse de anticorpii sintetizati fata de

antigenele bacteriene, care dau reactie încrucisata cu antigenele tisulare. In celulele epiteliale ale colonului uman se gaseste un antigen *lipoproteic*, care reactioneaza încrucisat cu anticorpii specifici fata de LPS de *E. coli*.

Sindromul Sjogren este o maladie autoimuna, caracterizata prin infiltrarea cu celule imunitare a glandelor salivare si lacrimale, cu inflamatia cronica si disfunctia acestor tesuturi.

Anemiile hemolitice autoimune

Anemiile hemolitice autoimune (AHA) reprezinta un grup de dezordini cu substrat imunitar, în care se sintetizeaza anticorpi specifici fata de una sau mai multe componente ale *membranei eritrocitare*, rezultatul fiind liza eritrocitelor. AHA sunt mediate de IgG si IgM.

Anemia hemolitica autoimuna se distinge de *anemia de aloimunizare* feto-materna, la care IgG matern trece prin bariera placentara. Maladia se deosebeste si de *anemiile hemolitice imunoalergice,* produse de medicamente care se cupleaza cu o proteina membranara si formeaza *conjugate* inductoare ale sintezei anticorpilor specifici.

Anemia hemolitica autoimuna este mediata de anticorpii anti-hematie, care se sintetizeaza fata de antigenele suprafetei eritrocitare si au specificitate, în primul rând fata de antigenele sistemului Rh. Anticorpii sunt IgG, *de reactie la cald* (adica se fixeaza pe eritrocite la 37^{o}) sau IgM, *de reactie la rece* sau *crioglobuline** (se fixeaza pe hematii la temperaturi mai mici de 30^{o}, în capilarele periferice, în sezonul rece). Cea mai comuna este maladia cu hemaglutinine la rece, primara sau idiopatica, asociata cu infectia produsa de *M. pneumoniae*, cu virusul Epstein-Barr sau cu virusul citomegalic. Hemoliza este dependenta de activarea cascadei complementului. Eritrocitele tapetate cu IgM se opsonizeaza cu C3b si acestea sunt captate de macrofagele din ficat, cu receptori pentru C3b.

In vivo, liza hematiilor survine la 37^{o}, conditii în care se fixeaza si complementul si de aceea s-a denumit *hemoliza la cald*. Simptomele apar la câteva ore dupa reexpunerea la rece: febra intensa, hemoglobinurie (datorata hemolizei), splenomegalie, deoarece se produce o sechestrare splenica masiva a hematiilor tapetate cu anticorpi. Intensitatea hemolizei este dependenta de titrul autoanticorpilor.

Macrofagele detecteaza eritrocitele tapetate cu IgG si le

fagociteaza în absenta C3b, dar în prezenta C3b, captarea lor este mai rapida. Hemoliza este aproape totdeauna extravasculara si celulele tapetate cu IgG sunt epurate în special în splina. De aceea, splenectomia este o masura strategica, cu remisiune partiala a maladiei.

Anticorpii adsorbiti pe suprafata hematiilor pot fi IgG sau IgM, dar pentru ca nu produc aglutinarea, s-au numit în mod eronat, *anticorpi incompleti*. Evidentierea anticorpilor adsorbiti pe hematii se face prin *testul Coombs direct,* denumit s*i testul antiglobulinic** .

Testul detecteza orice anticorp fixat pe suprafata hematiilor(anticorpi anti- Rh sau specifici fata de alte antigene eritrocitare) si utilizeaza antiseruri monospecifice marcate cu fluorocromi, obtinute pe iepure, fata de antigenele purificate: seruri anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, anti-C4. Serurile imune monospecifice se pun în contact cu eritrocitele bolnavului. Daca pe suprafata lor sunt adsorbiti anticorpii, se evidentiaza fluorescenta sau, daca titrul autoanticorpilor este prea mare, se produce chiar aglutinarea hematiilor.

Purpura trombocitopenica este o maladie autoimuna, caracterizata prin diminuarea numarului plachetelor sanguine, pâna la 1/10 din valoarea normala. In serul pacientilor se detecteaza anticorpi antiplachetari. Serul pacientilor determina aglutinarea plachetelor indivizilor normali si liza în prezenta complementului.

Pemphigus este o maladie a pielii si a membranelor mucoase, caracterizata prin *acantoliza,* adica pierderea aderentei intercelulare si prin sinteza autoanticorpilor ce se fixeaza pe suprafata celulelor epidermice. Anticorpii au specificitate fata de dezmosom, o componenta structurala cu rol în coeziunea celulelor epidermice. Autoanticorpii nu sunt declansatori ai maladiei, dar au rol important în progresia ei. Imunofluorescenta directa a epidermei lezate, evidentiaza imunoglobulinele legate pe suprafata celulelor epidermice. Nivelul anticorpilor anti-celule epidermice se coreleaza cu gravitatea leziunilor, iar îndepartarea anticorpilor prin plasmafereza este urmata de ameliorarea clinica. Maladia poate fi transferata pasiv, prin ser sau imunoglobuline de la pacienti. Anticorpii anti-epidermici apartin subclasei IgG_4.

Miozita este o maladie idiopatica(cauza necunoscuta) inflamatorie a muschilor, cu o componenta autoimuna. Adeseori, pacientii prezinta autoanticorpi specifici pentru una sau alta dintre maladiile autoimune. Cel mai adesea, autoanticorpii sunt specifici fata de proteinele sau ribonucleoproteinele cu rol în sinteza proteica si se cupleaza cu ARN.

Cei mai studiati sunt autoanticorpii fata de *histidil-ARNt sintetaza*

si respectiv glicil-, alanil-, treonil-, izoleucil-ARN sintetaza. Anticorpii se cupleaza cu ARN si inhiba actiunea enzimei. Titrul lor este variabil, în raport cu stadiul maladiei. Enzimele nu se gasesc pe suprafata celulelor musculare, dar se elibereaza prin liza celulelor musculare consecutiva infectiei cu un picornavirus miotropic, ca de exemplu virusul encefalomiocarditei. Aceste virusuri pot produce miozita si ARN viral poate fi substratul aminoacil-ARNt-sintetazei. Rolul autoanticorpilor în progresia acestei maladii este îndoielnic.

Alta componenta citoplasmatica, inductoare a sintezei anticorpilor este *miozina*. Miocardita, infarctul miocardic, chirurgia valvulara, grefarea arterelor coronare bypass induc sinteza anticorpilor antimiozina, dar nu se cunoaste rolul lor patologic.

În concluzie, reactiile autoimune, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor si generarea limfocitelor Tc autoreactive, însotesc multe maladii. Uneori, ele progreseaza spre maladii autoimune. Autoanticorpii specifici fata de componente ale suprafetei celulare (de exemplu, receptori de hormoni) sunt inductori ai proceselor patologice, iar cei specifici fata de tinte extracelulare (molecule circulante, matricea extracelulara) pot sau nu sa produca leziuni. Anticorpii specifici fata de tinte intracelulare produc efecte patogene, daca antigenul este eliberat din celula si devine accesibil sistemului imunitar, daca antigenul este orientat gresit si expus pe suprafata celulei sau daca o molecula ce da reactie încrucisata are o localizare accesibila fixarii anticorpilor.

Anticorpii îsi exercita efectele prin agregare, blocaj, stimulare, opsonizare, fixarea C, sensibilizare la actiunea altor celule efectoare.

Capitolul 9

IMUNODEFICIENTELE

Organismele imunodeficitare reprezinta, din punct de vedere clinic, adevarate “experiente ale naturii”, care, alaturi de studiile experimentale, au contribuit decisiv la fundamentarea conceptiei actuale cu privire la organizarea si functionarea sistemului imunitar. Analiza cazurilor clinice ale indivizilor imunodeficienti, a evidentiat faptul ca cele doua compartimente celulare ale sistemului limfoid sunt semiautonome, deoarece între ele exista multiple interdependente functionale.

Maladiile cu substrat imunitar (imunodeficientele) sunt heterogene, atât în expresia lor imunologica-clinica, cât si în privinta mecanismelor celulare si moleculare implicate.

Imunodeficientele pot fi *înascute* (primare) sau *dobândite* (secundare) si se datoreaza mai multor cauze:

– pot fi rezultatul unor *defecte genetice intrinsece* ale celulelor limfoide, care se manifesta prin erori ale diferitelor trepte de maturare, care se succed de la *celula stem* pluripotenta, pâna la celula T matura si respectiv, pâna la plasmocit. Deficienta poate fi datorata lipsei unor enzime esentiale pentru metabolismul celulei (de exemplu, metabolismul purinelor). Consecinta este absenta limfocitelor din organele limfoide si din circulatie;

– alteori se produc *deletii ale genelor* care codifica unele izotipuri de lant greu (H). Astfel, apar deficientele selective ale claselor de imunoglobuline;

– imunodeficientele se pot datora *slabei dezvoltarii a mediului necesar diferentierii* si maturarii celulelor limfoide (timus, GALT);

– imunodeficientele pot fi rezultatul *perturbarii mecanismelor reglatoare* ale celulelor Th si Ts, care controleaza raspunsul imun mediat celular si humoral;

– imunodeficientele pot surveni ca rezultat al *catabolizarii imunoglobulinelor* cu o rata excesiva, sau chiar datorita pierderii imunoglobulinelor din sânge si din secretii, desi celulele limfoide si imunoglobulinele sunt normale sub aspect numeric si respectiv, cantitativ;

Circa 50% din imunodeficiente se datoreaza sintezei deficitare a anticorpilor, 10% sunt imunodeficiente celulare, 20% sunt imunodeficiente combinate, 18% sunt deficiente ale fagocitelor si 2% sunt deficiente ale proteinelor complementului.

Imunodeficientele înascute

Imunodeficientele înascute (primare) au fost descoperite de O. Bruton (1952), odata cu descrierea *agamaglobulinemiei* si *hipogamaglobulinemiei* infantile sex-lincata. Maladia afecteaza baietii si se transmite prin cromosomul X. Pacientii ramân asimptomatici în primele luni de viata, deoarece în aceasta perioada imunoglobulinele materne asigura protectia antiinfectioasa. Dupa vârsta de 5-6 luni, pacientii devin foarte sensibili la infectiile tegumentare cu bacterii piogene si la infectii ale tractului respirator cu streptococi, meningococi, *H. influenzae*. Pacientii sunt lipsiti de reactivitatea imunitara mediata humoral. In tesuturile limfoide lipsesc plasmocitele, iar foliculii limfoizi nu se formeaza nici dupa stimularea antigenica repetata. La electroforeza, serul pacientilor nu releva fractia gamaglobulinica. IgG are concentratia de 1/10 (1 mg/ml fata de 10 mg/ml), iar IgM are concentratia de 1/100 din valorile normale. Lipseste IgA, dar lipsesc si hemaglutininele α si β. În mod normal limfocitele B reprezinta 5-18% din totalul limfocitelor circulante, dar la acesti pacienti, proportia lor este foarte mica (mai putin de 0,1%). Absenta limfocitelor B mature se datoreaza defectelor de maturare, determinate de *tirozin-kinaza* nefunctionala, codificata de gena mutanta.

Pacientii au reactivitate normala a imunitatii mediate celular: testul hipersensibilitatii întârziate la tuberculina este pozitiv, resping alogregele, limiteaza infectiile virale, cu exceptia hepatitei B (care evolueaza rapid spre ciroza) si a celor cu enterovirusuri. Limfocitele T au valori numerice normale. Vaccinurile virale atenuate sunt bine suportate si nu produc infectii clinice.

Disgamaglobulinemiile selective se caracterizeaza prin incapacitatea sintezei unui anumit izotip imunoglobulinic. Se cunosc deficiente selective ale IgM, IgA sau ale IgM si IgA, IgA si IgG, IgM si IgG.

Deficientele IgA se asociaza cu o frecventa crescuta a infectiilor tractului digestiv si respirator, iar deficientele sintezei IgG si IgM se însotesc cu cresterea sensibilitatii fata de infectiile tegumentare cu bacterii piogene: *Streptococcus*, *Staphylococcus*.

Agama-, hipogama- si disgamaglobulinemiile selective se

amelioreaza net, prin administrarea intravenoasa a gamaglobulinelor.

Sindromul Di George este consecinta hipoplaziei sau ageneziei timice. In cursul vietii embrionare se produce o perturbare a dezvoltarii structurilor derivate din perechile a 3-a si a 4-a de pungi faringiene. Agenezia timica este însotita de absenta paratiroidelor si de aceea, pacientii, initial, prezinta alte simptome: hipocalcemie, malformatii cardiace. Timusul este foarte redus ca dimensiuni sau chiar lipseste la 1/3 dintre pacienti. Adeseori, timusul exista sub forma glandelor ectopice. Imunitatea mediata humoral este normala, reflectata în valorile normale ale concentratiei imunoglobulinelor.

Daca supravietuiesc, la câtiva ani, pacientii manifesta sensibilitate înalta fata de infectiile virale, fata de bacteriile intracelulare sau fata de infectia fungica cu *Pneumocystis carinii*.

Imunodeficienta severa combinata (SCID) se caracterizeaza prin deficitul ambelor compartimente ale imunitatii, atât celular, cât si cel humoral. Deficienta se datoreaza absentei *celulelor stem* de origine a limfocitelor. Lipsesc limfocitele T, B si granulocitele, datorita hipoplaziei generalizate a *tesutului reticular hematopoetic*. Organele limfoide secundare sunt hipoplazice, iar timusul este absent. Lipsesc imunoglobulinele serice.

Pentru restabilirea functiei imunitare se impune *transplantul maduvei osoase*.

Imunodeficientele dobândite

Imunodeficientele dobândite (secundare) cuprind diverse maladii, datorate unor cauze patologice care interfera direct sau indirect cu functia imunitara.

Imunodeficientele dobândite pot fi cauzate de *hipercatabolismul* imunoglobulinelor. Concentratiile serice ale imunoglobulinelor reflecta raportul dintre rata sintezei si rata catabolismului acestor molecule. Cresterea ratei catabolismului poate sa conduca la o deficienta selectiva a unei clase de imunoglobuline, ce se manifesta prin *hipoproteinemie*.

Imunodeficientele dobândite se pot datora *pierderii excesive* a imunoglobulinelor, la nivelul tractului urinar sau gastrointestnal. Pierderea urinara este consecinta defectelor renale glomerulare, a unor disfunctii tubulare sau unor defecte combinate.

Deficientele glomerulare sunt asociate cu pierderea proprietatilor de sita ale endoteliului capilarelor glomerulare. Moleculele imunoglobulinice mici (IgG) trec în urina cu o rata superioara fata de moleculele mari (IgM). Totusi, IgG_3 si IgG_4 ramân normale, ceea ce

sugereaza ca, în afara greutatii moleculare, sunt importanti si alti factori care conditioneaza functia filtrului renal. Nivelul seric al IgG scade, proportional cu gradul perturbarii functiei de sita a endoteliului glomerular, iar IgM ramâne normal.

A II-a cale majora a pierderii majore a imunoglobulinelor este tractul gastrointestinal, la nivelul vaselor limfatice. Cele mai multe situatii patologice la acest nivel nu induc hipogamaglobulinemie, cu exceptia *limfangiectaziei intestinale*. Aceasta se caracterizeaza prin dilatarea excesiva a canalelor limfatice si este însotita de pierderea masiva de proteine si chiar a limfocitelor. Dilatarea vaselor limfatice este cauzata de obstructia limfatica, datorita unei infectii (de exemplu, tuberculoza), unei malignitati (limfom) sau datorita cresterii presiunii hidrostatice în insuficienta cardiaca severa congestiva. Rata sintezei imunoglobulinelor este normala sau crescuta, dar turnover-ul este rapid, datorita pierderii excesive a proteinelor la nivel intestinal.

Imunodeficiente datorate micronutrientilor. Deficienta *fierului* creeaza conditii predispozante pentru candidoza mucocutanata cronica. Deficienta *zincului* supreseaza functia celulelor T si predispune la infectii oportuniste. *Seleniul* este important pentru functia celulelor T. Deficienta partiala la copii, predispune la infectii.

Imunodeficiente induse de medicamente. Cele mai multe medicamente *citotoxice* si *imunosupresoare*, utilizate în tratamentul malignitatilor, al inflamatiilor si în imunosupresia pacientilor cu transplant de organe, deprima functia imunitara celulara si humorala, iar neutropenia predispune la infectii cu bacterii Gram negative si la infectii fungice. Compusii *steroidici* utilizati în tratamentul maladiei reumatismale, *ciclofosfamida* si *azatioprina*, folosite în tratamentul neoplaziilor, dupa administrare prelungita, deprima imunitatea mediata celular, dar si nivelul seric al imunoglobulinelor.

Unele imunodeficiente sunt consecutive altor procese patologice, care interfera cu efectorii sistemului imunitar: *deficienta renala* sau *hepatica* are ca efect acumularea substantelor toxice în organism, cu efect supresor asupra reactivitatii imunitare.

Dezechilibrul *endocrin,* cu producerea în exces a cortizonului suprarenalian (în maladia Cushing) este asociat cu imunodeficienta. Cortizonul lizeaza limfocitele T si B circulante si diminua monocitele periferice.

Starile neoplazice, în special cele care afecteaza sistemul imunocitar, monocitar sau granulocitar induc un deficit al functiei imunitare. In maladia Hodgkin – neoplazia liniei monocitare a ganglionilor limfatici – se instaleaza deficienta imunitatii mediate celular, dar imunitatea humorala este normala. In alte malignitati, efectele

neoplaziei asupra sistemului imunitar, nu s-au putut disocia de efectele provocate de casexie.

Mielomul multiplu (tumora plasmocitara localizata în maduva osoasa) este însotit de scaderea cantitativa severa a tuturor claselor de imunoglobuline normale si de aici, deficiente ample ale imunitatii humorale, dar imunitatea celulara ramâne normala.

Imunodeficienta consecutiva infectiei cu HIV

Imunodeficienta consecutiva infectiei cu virusul HIV este, în esenta, expresia incapacitatii organismului uman de a neutraliza virionii, în timpul fazei *acute* a infectiei. Dupa contactul primar cu antigenele HIV, organismul se apara prin mecanisme imunitare specifice. Se sintetizeaza anticorpi specifici, la un titru crescut. Testul ELISA pentru diagnosticul infectiei cu HIV se bazeaza pe detectarea anticorpilor anti-HIV. Titrul maxim al anticorpilor se coreleaza în timp, cu nivelul viremiei.

Imunitatea mediata celular anti-HIV se detecteaza foarte timpuriu dupa infectie si este dominata de numarul mare de limfocite TCD_8, al caror numar creste de 10-20 de ori fata de valorile normale (200-600/μl). Ele manifesta activitate citotoxica specifica anti-HIV si lizeaza limfocitele infectate, care expun pe suprafata lor, proteinele *env* (SU si TM).

Limfocitele TCD_8 diminua viremia primara, atât prin efect *citotoxic* direct asupra celulelor în care virusul se replica, cât si prin efect represor asupra replicarii virale, mediat de citochine. Celulele NK lizeaza celulele infectate prin mecanismul ADCC.

Raspunsul imun primar, humoral si celular represeaza replicarea virala dupa infectie. Desi foarte energic, raspunsul imun primar nu elimina complet virusul si nici celulele infectate. Organismul nu se sterilizeaza deoarece anticorpii specifici anti-HIV, produsi în timpul infectiei primare, nu au activitate neutralizanta optima. Anticorpii raspunsului imun primar, în esenta, *nu au efect protector*, deoarece raspunsul imun este neadecvat, fie cantitativ, fie calitativ. O proportie importanta a virionilor nu este neutralizata, pastrându-si infectiozitatea. Ramân de asemenea, multe celule infectate cu virus, în special în ganglionii limfatici, atât limfocite cât si celule foliculare dendritice.

Anticorpii neutralizanti se detecteaza mai târziu, dupa trecerea de la faza acuta a infectiei, *la faza cronica*. Probabil ca anticorpii neutralizanti sunt specifici fata de epitopii care nu sunt expusi pe virionii asamblati în cursul infectiei primare sau anticorpii raspunsului imun secundar sufera fenomenul maturarii de afinitate si se leaga mai eficient de epitopi.

Pe masura ce infectia progreseaza, anticorpii neutralizanti sunt înlocuiti cu *anticorpi stimulatori* (enhancing) ai infectiei. Anticorpii stimulatori favorizeaza infectia celulelor, prin intermediul receptorului pentu C_3 sau pentru Fc. Ineficienta anticorpilor este explicata prin aceea ca una din glicoproteinele de învelis al virionilor este foarte glicozilata (circa 24 de situsuri de glicozilare), pe o secventa de 481 aminoacizi. Gruparile glucidice mascheaza epitopii antigenici si împiedica neutralizarea virusului.

Imunodeficienta grava este consecinta directa a scaderii dramatice a numarului de limfocite TCD_4 circulante, de la circa 1000 la 100/μl. Daca în stadiul preclinic, proportia limfocitelor producatoare de virus este de 1/40, în stadiile avansate, proportia este 1/10.

Cauza principala a scaderii numarului de limfocite TCD_4 este *liza* consecutiva infectiei cu HIV. Proteinele virale sintetizate în celula au efect toxic. Legarea HIV de membrana si penetrarea în celula, este asociata cu cresterea volumului celular. Celula pierde controlul influxului ionilor si al apei. Aceste modificari s-au reprodus *in vitro* cu glicoproteina 120 de HIV. Efectul toxic al glicoproteinelor virale este reversat de antagonistii canalelor de Ca^{2+}, utilizati în clinica pentru a atenua anomaliile neurologice consecutive infectiei cu HIV.

La pacientii infectati cu HIV, o proportie semnificativa de limfocite, dupa stimularea cu antigenele virale, în loc sa se activeze si sa se divida, se sinucid prin *apoptoza*, adica prin activarea programului genetic al mortii.

O alta cauza a imunodeficientei o constituie *anergia* limfocitelor. Cele doua glicoproteine (120 si 41)rezulta prin clivajul enzimatic al proteinei precursoare 160. Clivajul proteinei 160 este esential pentru infectiozitatea virala. Glicoproteina 120 asociata necovalent cu gp 41pe suprafata învelisului viral, este usor eliberata de pe suprafata celulei si a învelisului. Glicoproteina 120 sintetizata în exces, se gaseste libera(“solubila”) în sânge si se leaga de receptorul CD_4, producând perturbari ale reactivitatii imunitare, prin blocarea reactivitatii limfocitelor. Afinitatea interactiunii gp 120 cu CD_4 este conferita de resturile sale glucidice. Starea de anergie poate fi reversata sub actiunea stimulatoare a IL-2. Complexele imune gp 120-anti gp 120 s-au identificat pe suprafata limfocitelor, la pacientii infectati cu HIV.

HIV-1 infecteaza limfocitele TCD_4, dar si monocitele, macrofagele, celulele dendritice, celulele Langerhans, celulele trofoblastice placentare, neuronii.

Scaderea ampla a numarului de limfocite TCD_4, detectabila în

testul transformarii blastice cu mitogene, anuleaza functia lor reglatoare asupra functiei imunitare. Limfocitele viabile asigura persistenta infectiei. Diminuarea sintezei IL-2 încetineste proliferarea si diferentierea limfocitelor Tc. In absenta celulelor Tc activate, multiplicarea virala este necontrolata. Consecutiv scaderii sintezei IL-2, diminua activitatea macrofagelor si a celulelor NK.

La organismele infectate cu HIV, numarul limfocitelor B este normal, iar concentratia imunoglobulinelor este de circa 10 ori mai mare decât la persoanele sanatoase. Explicatia cresterii titrului anticorpilor este ca, în absenta limfocitelor TCD_4, celulele Ts nu-si îndeplinesc rolul fiziologic de a supresa activarea limfocitelor B, diferentierea lor si sinteza Ig. Limfocitele B se activeaza nespecific, *policlonal*. Se sintetizeaza anticorpi la un titru crescut, dar nu au specificitate anti-HIV si nu sunt protectori nici fata de alti agenti patogeni sau potential patogeni.

Data fiind specificitatea interactiunii gp 120 cu receptorul limfocitar CD_4, s-a încercat utilizarea CD_4 solubil ca agent *imunoterapeutic*. Tulpinile virale de laborator au fost neutralizate eficient de preparatele CD_4, dar izolatele primare de HIV-1 sunt relativ rezistente. Absenta neutralizarii infectiozitatii s-a atribuit mecanismelor complexe de intrare a virusului în celula. CD_4 solubil stimuleaza eliberarea gp 120 din învelisul viral, ceea ce determina cresterea infectiozitatii.

Grupurile cu risc major de îmbolnavire sunt cele ale homosexualilor si ale consumatorilor de droguri. Virusul se transmite si pe cale heterosexuala, mai ales la femei, care transmit infectia fatului.

Capitolul 10

IMUNOLOGIE TUMORALA

Dupa malignizare, membrana citoplasmatica este cea mai modificata structura celulara. Semnalele reglatoare de control al cresterii si multiplicarii, care actioneaza în primul rând prin intermediul receptorilor membranari, nu-si mai gasesc tinta structurala. Incapacitatea celulelor de a receptiona semnalele reglatoare ale cresterii si diviziunii sau de a raspunde adecvat acestor semnale, este cauza principala a comportamentului invaziv al celulelor maligne. Pierderea inhibitiei de contact este reflectarea modificarilor suprafetei celulare.

Adeseori, malignizarea este însotita de sinteza unor molecule noi, localizate în oricare din compartimentele celulei si care se comporta ca *antigene tumorale*.

Orice structura chimica a celulei maligne, absenta în sau pe celulele normale ale tesutului de origine a tumorii, susceptibila de a induce o reactie imunitara la gazda primara sau dupa injectare la o noua gazda, poate fi considerata ca antigen tumoral.

ANTIGENE TUMORALE

Se disting urmatoarele categorii de antigene tumorale:

1. *Antigenele tumorale de diferentiere*, denumite si *antigene oncofetale*, deoarece se gasesc atât pe suprafata celulelor unor tumori, dar sunt prezente si în timpul unei faze de diferentiere embrionara. Ele lipsesc pe suprafata celulelor organismului adult sau se gasesc în cantitati foarte mici, nedectabile.

a) *Antigenul carcinoembrionar* (CEA) s-a izolat din sângele unui pacient cu cancer de colon (1965). Este o glicoproteina de 180-200 kD, localizata pe membrana celulelor normale ale tractului digestiv la fat, dar se gaseste în cantitati foarte mici la subiectii normali adulti.

La fat, CEA este sintetizat în celulele mucoasei gastro-intestinale si este concentrat în glicocalix, pe suprafata luminala a acestor celule. In celulele embrionare normale, CEA pare a avea rol în aderenta celulara, dar probabil favorizeaza metastazarea celor maligne.

CEA este un grup foarte heterogen de molecule, cu o cantitate foarte variabila de glucide. Raportul proteine/glucide variaza între 1/1 si 1/5. Componenta glucidica este reprezentata, în primul rând, de acidul sialic. Imunogenitatea moleculei este conferita de componenta proteica.

La adult, CEA se gaseste în cantitati mici pe mucoasa colonului, în plamân, în tesutul mamar, dar reapare în cantitati mari pe celulele maligne ale tractului digestiv uman (intestin subtire, pancreas, ficat, stomac, colon, rect). CEA se gaseste nu numai asociat suprafetei celulelor maligne, dar trece si în sângele a 60-80% dintre pacientii cu cancer de colon. Nu se cunoaste mecanismul prin care CEA ajunge în sânge.

Din sângele pacientilor neoplazici, CEA sintetizat de celulele maligne, este epurat la nivelul ficatului. De aceea, cele mai mari concentratii de CEA apar la neoplazicii cu insuficienta hepatica (metastaze hepatice, ciroze).

CEA este un *antigen nespecific*, deoarece poate sa apara, în concentratii mici (10 ng/ml), în sângele unor pacienti cu maladii nemaligne: la cei cu ciroza alcoolica a ficatului sau cu insuficienta renala, astfel ca speranta detectarii cancerului prin depistarea CEA în sânge, s-a naruit.

Leziunile de orice natura ale mucoasei tractului gastrointestinal sunt însotite de cresterea sintezei si secretiei CEA, care trece si în sânge: în maladia inflamatorie a intestinului, în colita ulcerativa, polipi ai tractului digestiv, tumori ale tractului gastrointestinal.

Unele tumori secreta CEA, mai ales dupa o metastazare hepatica (adenocarcinomul colonului, tumorile de pancreas, ficat, plamân).

Nivelul CEA foarte crescut, reflecta o evolutie rapida a tumorii.

b) *Alfafetoproteina (AFP)* este o glicoproteina majora a fatului timpuriu, o globulina normala (69 kD)a sângelui fetal uman si a celorlalte mamifere, descoperita în 1956. Continutul glucidic este de 3,5%. Din punct de vedere structural, AFP este asemanatoare albuminei. Genele codificatoare ale celor doua proteine au organizare similara. AFP se detecteaza în plasma la embrionul de 4 saptamâni si creste rapid în primul trimestru de sarcina. Nivelul maxim (2-3 mg/ml) se gaseste la fatul de 14 saptamâni si scade la valorile caracteristice adultului, la vârsta de 6-10 luni. AFP se gaseste nu numai în plasma, ci si în fluidele fetale: lichidul amniotic, lichidul cerebrospinal, urina. Cantitati mici de AFP (500 ng/ml) strabat placenta si se gasesc în serul femeilor gravide.

În timpul vietii fetale, AFP se sintetizeaza în ficat, în celulele gastrointestinale. La adultul normal, concentratia sa este nedetectabila prin metodele imunochimice obisnuite, dar creste în neoplaziile de

carcinom hepatic. Circa 70% din cancerele hepatice primare sunt însotite de cresterea nivelului seric al AFP. AFP creste si în alte neoplazii: testiculare, ovariene. Nu toate hepatoamele si tumorile testiculare produc AFP, dar cele care sintetizeaza aceasta glicoproteina, o produc în cantitati foarte mari.

Cresterea concentratiei AFP în sânge nu este totdeauna asociata cu malignitatea: AFP creste în starile patologice de hepatita virala, hepatita cronica, ciroza, fapt ce reflecta regenerarea celulara.

AFP creste în maladiile inflamatorii ale intestinului: boala Crohn, colita ulcerativa.

AFP este un marker util pentru depistarea cancerului hepatic la populatiile cu risc înalt (chinezi, japonezi, eschimosi din Alaska), dar este inutila pentru celelalte populatii, datorita cresterii nivelului sau în afectiuni nemaligne.

În lichidul amniotic, nivelul crescut al AFP este asociat cu defecte ale tubului neural (spina bifida).

2. Antigenele de transplantare a tumorilor (TATA = *t*umor *a*ssociated *t*ransplantation *a*ntigen).

a) *Antigenele specifice de organ* se exprima la un nivel înalt pe celulele tumorale, în timp ce exprimarea lor pe celulele normale este foarte scazuta sau este limitata la un anumit stadiu al dezvoltarii tesutului.

Antigenul specific prostatei (PSA) este *fosfataza acida prostatica*, o glicoproteina cu activitate proteolitica asupra gelului seminal, pe care-l hidrolizeaza. PSA se gaseste în tesutul prostatic normal, în adenomul benign si în carcinomul malign. Este produs de celulele acinare ale prostatei. În ser, PSA este legat cu α 1-antichimiotripsina, ceea ce influenteaza valorile furnizate de determinarea sa cantitativa.

PSA creste mult în cancerul prostatic, cel mai comun cancer la vârsta de peste 75 se ani, dar creste si în hipertrofia prostatica benigna. Concentratia sa se coreleaza cu volumul prostatei, cu stadiul cancerului prostatic, cu raspunsul la terapie.

Glicoproteinele mucinoase sunt antigene de suprafata celulara, cu greutate moleculara mare.

Sunt formate dintr-o axa polipeptidica, de care se ataseaza numeroase catene oligozaharidice. Glucidele reprezinta 60-80% din greutatea lor moleculara. Sinteza glicoproteinelor mucinoase este consecinta pierderii controlului metabolismului celulei neoplazice. Uneori, celula maligna pierde capacitatea de sinteza a unor glicoproteine de suprafata, ca de exemplu antigenul de grup sanguin A si sintetizeaza molecule absente în celulele normale.

Glicoproteinele mucinoase se exprima pe suprafata celulelor

epiteliale si se detecteaza în ser, saliva, ori sunt adsorbite pe eritrocite. Ele s-au identificat odata cu disponibilitatea anticorpilor monoclonali: CA 15-3, CA 125, asociate cu cancerele ovariene, CA 19-9, identificat într-o tumora colorectala (CA = cancer associated). Modificarea cantitativa a glucidelor membranare poate modifica dramatic malignitatea, influentând potentialul de metastazare.

Markerii tumorali imunoglobulinici se identifica prin electroforeza serului sau a urinii. Apartin izotipurilor IgG, A, M, E sau sunt catene k sau λ libere. Aproximativ, 1% din adulti au *proteine serice M* (monoclonale), iar din acestea 25% au semnificatie nedeterminata. 50% din totalul proteinelor serice M sunt datorate mielomului multiplu. Determinarea proteinelor M în sânge sau urina este utila pentru monitorizarea raspunsului la terapie.

b) *Antigenele specifice fiecarei tumori* sunt *antigene individuale* (TSTA = *t*umor *s*pecific *t*ransplantation *a*ntigen), proprii fiecarei tumori. Sunt exprimate numai în celulele tumorale si nu sunt niciodata detectabile în tesuturile normale. Sunt caracteristice tumorilor induse chimic (L. Gross, 1953). Chiar tumorile multiple induse de acelasi agent chimic (metilcolantren), în acelasi tesut (tegument) al unui organism, sunt diferite în ceea ce priveste specificitatea antigenelor de transplantare. Aceasta semnifica faptul ca informatia genetica declansatoare a malignizarii, rezida în gene diferite, care sufera mutatie sub actiunea agentului chimic.

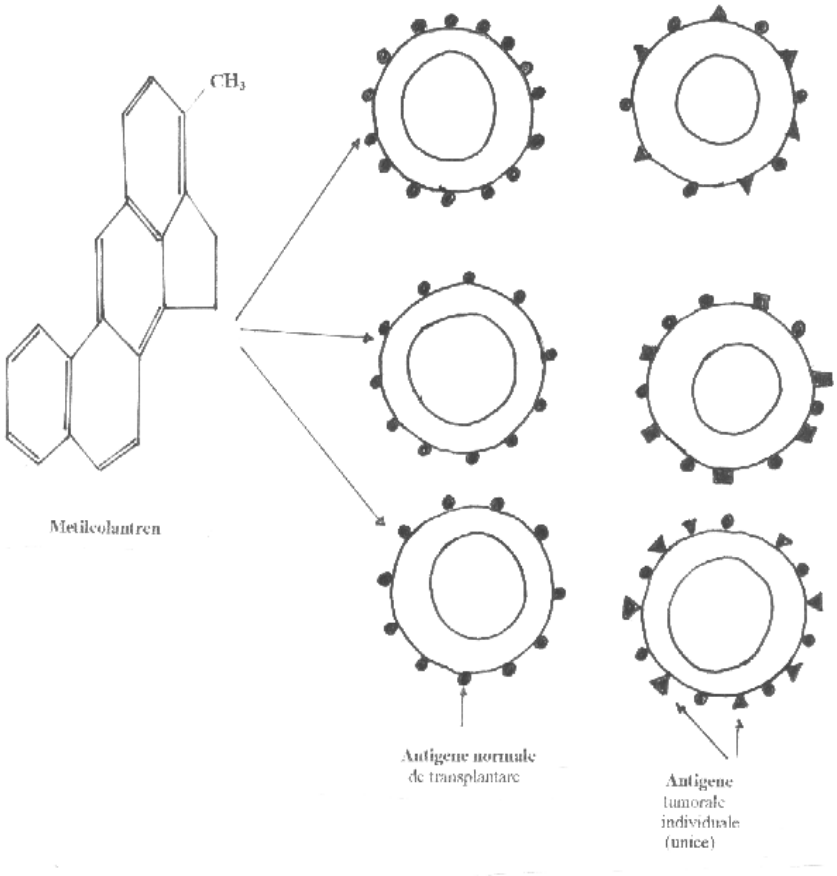


Fig. 131. Tumorile tegumentare induse de un agent chimic (de exemplu, metilcolantrenul) poseda *antigene tumorale strict individuale*.

Toate celulele unei tumori induse de metilcolantren sunt identice din punct de vedere antigenic, fapt demonstrat experimental: soarecele imunizat cu mojarat de celule tumorale, respinge ulterior o grefa de celule vii ale aceleiasi tumori.

Datorita unicitatii lor antigenice, fiecare tumora indusa chimic, stimuleaza imunitatea fata de antigenele proprii, iar reactiile încrucisate sunt absente totdeauna.

Antigenele tumorale specifice de transplantare sunt complexe *glicoproteice* sintetizate în celula si inserate în membrana citoplasmatica.

Celulele maligne pot sa prezinte simultan, atât antigene tumorale comune, cât si antigene specifice.

Tumorile care apar în mod natural sunt slab sau deloc antigenice.

Nu se stie daca antigenele tumorale sunt prezente de la început pe toate celulele tumorale sau daca celula devine maligna, fara sa dobândeasca markerii distinctivi de malignitate. Antigenele tumorilor induse de agenti chimici pot fi stabile si se transmit de la o generatie celulara la alta, dar majoritatea tumorilor induse de agenti chimici, trebuie considerate heterogene din punct de vedere antigenic, datorita instabilitatii genetice.

Antigenele suprafetei celulelor maligne sunt supuse modificarilor cantitative si calitative.

La om, 90% din tumori sunt induse de agenti chimici.

3. *Antigenele de origine virala* sunt comune si se gasesc la toate tumorile induse de acelasi virus, chiar la specii diferite.

Antigenele tumorilor induse de *oncodnavirusuri* sunt codificate de programul timpuriu al informatiei genetice virale. De exemplu, virusurile polioma si SV_{40} induc tumori la animalele de experienta, iar virusul papiloma este implicat în geneza tumorilor de cervix uterin uman.

Virusurile oncogene ADN induc sinteza antigenelor tumorale cu localizare nucleara si membranara. Sunt *proteine nestructurale*, care se disting de antigenele capsidei virale. In celulele transformate cu oncodnavirusuri, nu se detecteaza antigene capsidale, deoarece programul tardiv al genomului viral nu este transcris si virusul progen nu este asamblat.

SV_{40} codifica sinteza a doua proteine virale (antigene tumorale), de 94 si respectiv 17 kD, iar virusul polioma codifica sinteza a trei antigene, de 100, 55 si respectiv de 22 kD. Antigenul T de 100 kD are o localizare aproape exclusiv nucleara si se sintetizeaza atât în celulele infectate productiv, cât si în cele transformate. Antigenul de 55 kD este o proteina fosforilata ce se asociaza cu oncoproteina *Src*, o chinaza tirozin-specifica, codificata de protooncogena *c-src*. Interactiunea cu antigenul viral produce o stimulare de circa 50 de ori a activitatii chinazice a oncoproteinei celulare *Src*.

Antigenele *T* sunt comune si pentru alte virusuri ale grupului. Toate tumorile induse de un virus, au antigene comune, chiar la specii diferite. Imunizarea organismului receptor de grefa de tesut tumoral cu celule tumorale iradiate sau cu mojarat de celule tumorale de acelasi tip este protectoare fata de dezvoltarea tumorii transplantate.

Antigenele T, codificate de oncodnavirusuri nu se gasesc în structura virionului (proteine nestructurale). De aceea, virionii inactivati nu imunizeaza si nu protejeaza organismul fata de suspensia de celule tumorale omologe (transformate de acelasi virus).

Antigenele tumorale codificate de *oncornavirusuri* sunt comune pentru toate tumorile induse de un virus, indiferent de specificitatea antigenica a celulei. Majoritatea sunt antigene proteice virale *structurale*, adica se regasesc în structura virionului, ceea ce le deosebeste net de

antigenele codificate de oncodnavirusuri.

Antigenele tumorilor induse de oncornavirusuri sunt codificate de gena *env* si au specificitate de grup. Multiplicarea oncornavirusurilor nu interfera cu capacitatea celulelor de a creste si de a se divide. Deoarece antigenele tumorale sunt proteine structurale ale virionilor, imunizarea organismului cu o suspensie virala inactivata, confera protectie fata de celulele transformate de virusul omolog.

Spre deosebire de antigenele induse chimic, care pot fi tari sau slabe, antigenele codificate de virusurile oncogene sunt foarte imunogene.

La om, circa 10% din totalul tumorilor sunt cauzate de virusuri:

– carcinomul hepatocelular (indus de virusul hepatitei B)

– cancerul de col uterin (indus de papilomavirusuri – HPV_{16}, HPV_{18})

– limfomul Burkitt si carcinomul nazofaringian (induse de virusul Epstein-Barr)

– leucemia celulelor T mature (indusa de HTLV-1).

4. *Antigenele tumorale codificate de protooncogene*. Mutatiile punctiforme ale oncogenelor – genele ce regleaza cresterea normala si diferentierea - si mutatiile genelor supresoare ale oncogenelor, ca de exemplu, p53 si Rb, produc substitutii ale unui singur aminoacid în catena polipeptidica codificata, care le transforma în antigene tumorale, codificate de genom. Ele au localizare nucleara, citoplasmatica sau membranara. S-au descris peste 10 antioncogene (supresoare ale oncogenelor) si circa 100 de oncogene (de exemplu, genele *ras*), ale caror *mutatii punctiforme* determina sinteza unor molecule cu substitutii punctiforme de aminoacizi, unice sau multiple si care se deosebesc de moleculele normale. Antioncogena p53 codifica o proteina nucleara, reglatoare a diviziunii celulare. In celulele maligne, p53 se sintetizeaza în exces.

Dupa localizare, antigenele tumorale sunt:

– antigene expuse la suprafata celulei. Sunt cele mai importante, deoarece sunt accesibile efectorilor raspunsului imun (TSTA, TATA);

– antigene intracelulare, localizate în nucleu sau în citoplasma.

Ambele categorii de antigene, se pot elibera fie din celulele vii, fie dupa necroza si se gasesc în circulatie, la distanta de tumora. Eliberarea lor poate stimula raspunsul imun sau are un efect de blocare a reactivitatii imunitare, prin fenomenul de *inundare antigenica*.

Anticorpii antitumorali se obtin prin injectarea celulelor tumorale viabile, ori a mojaratului tumoral, la organismele altei linii genetice sau altei specii, care poarta alte molecule CMH. Celulele vor fi respinse ca o grefa alogenica. Antiserul contine anticorpi anti-antigene tumorale, dar si anticorpi anti-antigene CMH. De aceea, serul imun trebuie absorbit cu antigene tisulare normale. Astfel s-a evidentiat CEA la pacientii cu

tumori de colon si AFP la cei cu hepatoame. Antigenul evidentiat de anticorpi în serul absorbit poate fi un antigen tumoral sau un antigen normal, exprimat abundent pe celulele tumorale.

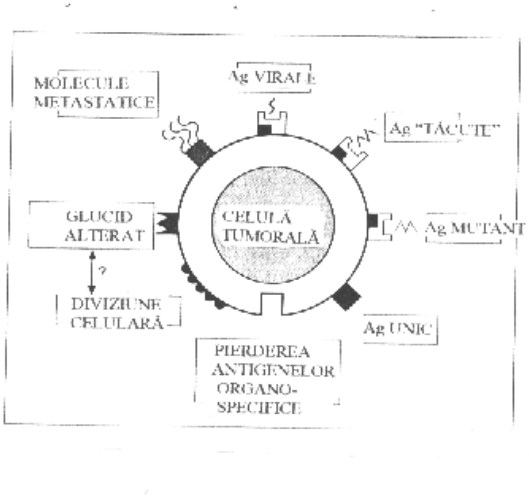


Fig. 132. *Modificari ale suprafetei celulei*, asociate cu transformarea maligna (dupa Roitt, 1997).

Procesul dezvoltarii tumorii are loc în câteva trepte:

– transformarea celulei normale în celula maligna

– cresterea exponentiala a celulei maligne si constituirea tumorii primare

– angiogeneza

– invazia tesutului înconjurator

– intravazarea si eliberarea celulelor tumorale individuale, în vasele sanguine si limfatice, unde trebuie sa supravietuiasca

– oprirea celulelor tumorale în diferite localizari (ficat, plamân etc.)

– extravazarea celulelor tumorale si invazia acestor tesuturi

– cresterea tumorii la noile situsuri de metastazare si angiogeneza.

Fiecare etapa a dezvoltarii tumorii este influentata de factori imunologici si neimunologici. De exemplu, integrinele conditioneaza interactiunile dintre celule. Cu cât aderenta celulelor maligne este mai bine exprimata, cu atât tendinta ei de metastazare este mai limitata. Celulele maligne elibereaza unele componente membranare, ca de exemplu, fibronectina. Pierderea fibronectinei pare sa determine scaderea aderentei majoritatii tipurilor de celule maligne si precede metastazarea. Componentele glicocalixului sunt eliberate sub actiunea

proteazelor, pe care le secreta celulele tumorale. Proteazele (din categoria metaloproteazelor) modifica consistenta substantei fundamentale a tesutului conjunctiv, degradeaza colagenul si proteoglicanii, usurând metastazarea si invazia.

RASPUNSUL IMUN ANTITUMORAL

Cresterea anormala este prevenita prin diferite mecanisme de control: mecanisme de reparare a ADN, actiunea genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene) sau prin apoptoza celulelor care au suferit leziuni ireversibile. Daca aceste mecanisme nu mai sunt operative, celula continua sa prolifereze. Celula maligna se afla într-o interactiune dinamica cu micromediul, ce determina supravietuirea sau moartea ei.

Imunogenitatea tumorilor pentru gazda si stimularea timpurie a raspunsului imun antitumoral a condus la formularea conceptului *imunosupravegherii*, în acord cu care, organismele elimina celulele potential canceroase care apar în cursul vietii individuale. Conform acestui concept, cancerul clinic este consecinta scaparii celulelor maligne, de actiunea mecanismelor protectoare. De aceea, factorii care interfera cu reactivitatea imunitara, predispun la malignitate. In conceptia actuala, malignizarea este rezultatul *activarii oncogenelor* sau *pierderii functiei genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene).*

Teoria supravegherii imune afirma ca sistemul imunitar, monitorizeaza constant organismul, pentru aparitia celulelor tumorale si ca majoritatea acestor celule aberante suntdetectate si lizate de sistemul imunitar, înainte de a produce tumori clinice. Asa se întâmpla cu celulele tumorale intens imunogene. Majoritatea (sau toate) celulele tumorale care apar spontan, sunt imunogene si raspunsul imun inhiba cresterea tumorii.

Argumentele în favoarea sau contra acestei teorii sunt greu de obtinut. Ele sunt extrapolate din observatii asupra tumorilor clinice.

Disparitia spontana a tumorilor si recuperarea completa a pacientilor cu cancer diseminat, este rara, dar exista si este explicata prin insuficienta vascularizatiei, prin procese de diferentiere a celulelor tumorale, prin mecanisme psihosomatice. O explicatie *imunologica*, este ca raportul dintre cresterea tumorii si raspunsul imun antitumoral este în favoarea raspunsului imun. Exista dovezi care sugereaza ca organismul uman raspunde la prezenta tumorilor, prin mecanisme imunitare:

– *regresia spontana*, în special a meloanoamelor maligne, a carcinoamelor renale, a neuroblastomului si retinoblastomului,

semnalata în peste 100 de cazuri publicate;

– unele tumori *evolueaza latent*, o lunga perioada, adica cresc foarte încet sau sunt complet inactive si apoi brusc metastazeaza. Latenta se poate explica prin echilibrul dintre tumora si sistemul imunitar;

– frecvent tumorile sunt *infiltrate cu celule mononucleare*: limfocite, monocite, putine plasmocite. Celulele T si macrofagele sunt prezente abundent în tumorile umane, sugerând un raspuns imun antitumoral. Celulele T activate fata de tumora autologa, s-au izolat din câteva tipuri de tumori(melanom malign, carcinom renal, cervical). Ele recunosc peptide asociate cu moleculele CMH I, care sunt represate în celulele normale sau peptide derivate din proteinele mutante;

– carcinoamele asociate cu *reactie inflamatorie* evolueaza mai lent decât cele care nu manifesta un raspuns inflamator;

– tumorile sunt mai frecvente la organismele foarte *tinere* (datorita imaturitatii sistemului imunitar) si la cele *vârstnice* (datorita senescentei sistemului imunitar);

– anumite categorii de tumori (cancerele de piele cu papiloma virus, limfoamele pozitive pentru antigenele EBV) au o incidenta crescuta la pacientii cu transplant, supusi *imunosupresiei*. Imunosupresia prelungita (20 de ani), este asociata cu cresterea incidentei tumorilor de origine virala, în timp ce incidenta celorlalte categorii de tumori, creste foarte putin. Dovezile clinice sugereaza ca raspunsul imun este orientat predominant fata de infectia cu virusuri oncogene si neoncogene, iar rata aparitiei altor tumori este relativ nemodificata. Aceasta arata, indirect, ca supravegherea antitumorala este relativ ineficienta. Datele experimentale sprijina ideia ca supravegherea imuna este orientata, în primul rând, fata de virusuri oncogene ADN si nu fata de oncorna- sau fata de tumorile induse de agentii chimici carcinogeni.;

– *celulele metastatice* sunt comune la pacientii cu cancer, dar frecventa implantarii lor si cresterea tumorilor secundare este mica.

Efectorii raspunsului imun antitumoral

Daca sunt prezente, multe antigene tumorale stimuleaza raspunsul imun la animalele de experienta si pot induce o stare de rezistenta antitumorala fata de celulele transplantate. Raspunsul imun antitumoral are o eficienta foarte variabila, în functie de natura antigenelor. Astfel, antigenele induse de virusurile oncogene sau ale tumorilor induse de radiatiile UV, sunt foarte imunogene si stimuleaza raspunsul imun protector, iar antigenele de transplantare ale tumorilor

induse chimic sunt slabe. Tumorile care apar spontan la animale si la om sunt putin antigenice si induc un raspuns imun de mica intensitate.

Antigenele asociate celulelor tumorale sunt recunoscute ca nonself, de sistemul imunitar al gazdei, dar tumorile secreta *antigene solubile*, care tind sa produca fenomenul de inundare antigenica si paralizie imunitara.

Raspunsul imun antitumoral este *humoral* si *celular*. Anticorpii specifici, de cele mai multe ori, nu au eficienta antitumorala. Cel mai adesea, celulele tumorale supravietuiesc actiunii factorilor humorali si se multiplica. Ineficienta actiunii lor s-a demonstrat în experiente cu celule maligne închise în camere poroase, permeabile numai pentru molecule, amplasate în cavitatea abdominala a unor organisme imunizate cu mojarat de tesut tumoral. Anticorpii sunt efectori eficienti fata de celulele maligne de origine limfoida (leucemii, limfoame). Dupa activarea complementului, se produce liza celulei tinta.

Efectorii imunitatii antitumorale sunt *celulele*. Rolul lor s-a demonstrat cu acelasi gen de experimente, cu celule maligne plasate în camere poroase, care permit trecerea celulelor efectoare ale raspunsului imun. Rezultatul actiunii celulelor imunitare este liza celulei tinta.

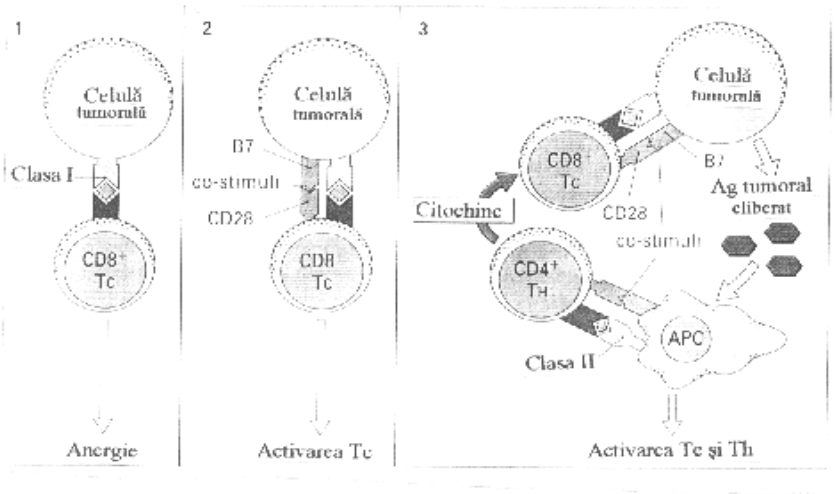


Fig. 133. *Antigenul tumoral* poate fi prezentat celulelor T, pe diferite cai: direct, în absenta co-stimulilor necesari, rezultatul fiind anergia; direct de celula tumorala care exprima molecule co-stimulatoare, rezultând activarea celulelor Tc; direct de celulele tumorale si indirect via CPA, producând activarea limfocitelor Tc si Th (dupa Roitt, 1997).

Imunitatea celulara antitumorala este mediata de celule capabile sa lizeze celulele tinta, prin interactiune specifica sau de celule care nu necesita procese de recunoastere specifica.

Rolul celulelor NK

Celulele NK sunt cei mai importanti efectori ai imunitatii antitumorale. Actiunea lor nu este limitata de identitatea moleculelor CMH si îsi exercita efectul prin contact direct. Celulele NK nu necesita prezentarea antigenului de catre celulele accesorii. Mecanismul molecular al interactiunii lor cu celula tinta nu este cunoscut.

Activitatea celulelor NK se modifica cu vârsta: are nivel scazut la nastere, atinge maximum la pubertate si scade gradat cu vârsta. Activitatea lor fata de celulele maligne, *in vitro*, este invers proportionala cu nivelul moleculelor CMH I, exprimate pe suprafata celulelor maligne. Exprimarea moleculelor CMH I poate duce chiar la scaparea celulelor tumorale de a fi recunoscute de celulele NK, *in vivo*. Se presupune ca celulele NK controleaza celulele pentru nivelul expresiei CMH I. Celulele care au pierdut total sau partial moleculele CMH I, par a fi recunoscute ca tinte si lizate. Deoarece actiunea celulelor NK nu este restrictiva în raport cu moleculele CMH, ele sunt active fata de celulele tumorale singenice, alogenice si chiar xenogenice.

Importanta functionala a celulelor NK pentru protectia antitumorala este argumentata de faptul ca liniile de soareci congenital atimici sau cei timectomizati neonatal au un numar mare de celule NK

Celulele K interactioneaza cu celula tinta prin intermediul receptorilor pentru Fc γ. Celula tumorala tapetata cu IgG este astfel usor recunoscuta de celulele K. Ele se activeaza si lizeaza celula tinta prin fenomenul ADCC.

Activitatea celulelor NK si K din sânge, testata *in vitro*, scade odata cu progresia tumorii. La contactul cu celula maligna, direct sau mediat de anticorpi, celula efectoare elibereaza factori citotoxici solubili: perforina, proteaze, TNF-α, limfotoxina (TNF-β). Mecanismul eliberarii factorilor litici este acelasi, descris pentru limfocitulTc.

Celulele NK, activate *in vitro* de IFN-γ si de IL-2, se numesc LAK (celule *k*iller *a*ctivate de *l*imfochine).

Activarea celulelor NK si K nu produce memorie imuna. Nu exista diferente între raspunsul imun primar si secundar.

Citotoxicitatea mediata de macrofage

Macrofagul neactivat (de la indivizi normali) exprima un nivel minim de *citotoxicitate antitumorala.*

Macrofagul *activat* distinge celulele tumorale de celulele normale si poate sa omoare selectiv, celulele tumorale. Activitatea sa citotoxica este independenta de moleculele CMH, dar este dependenta de factori genetici.

Macrofagul se activeaza în urmatoarele situatii:

– dupa ce leaga prin receptorul pentru Fc, moleculele de imunoglobulina fixate pe determinantii antigenici ai celulei maligne sau complexele Ig—Ag tumoral solubil;

– sub actiunea factorilor eliberati de celulele T sensibilizate (IFN γ)

– sub actiunea endotoxinelor bacteriene

– sub actiunea antigenelor de *Mycobacterium, Listeria, Toxoplasma* sau dupa infectia cu aceste microorganisme intracelulare.

Activarea consta în *amplificarea ratei metabolice* si macrofagul devine killer potential al celulelor tumorale. Macrofagul activat nu interactioneaza cu antigenele tumorale specifice, dar ca si celulele NK, pare sa distinga între celulele maligne si cele normale, prin mecanisme moleculare necunoscute.

Macrofagele activate secreta diferite molecule antitumorale:

– enzime hidrolitice care degradeaza tesutul conjunctiv

– IFN-α, activator al celulelor NK

– TNF-α (casectina) cu efect stimulator asupra altor celule care elibereaza IL

– H_2O_2 si produsi de oxidare a glucozei, cu efect toxic direct asupra celulei tinta, prin perturbari membranare

– oxidul nitric (NO), toxic pentru celulele maligne. NO se formeaza prin combinarea oxigenului cu azotul derivat din dezaminarea enzimatica oxidativa a L-argininei. Reactia este catalizata de nitric-oxid-sintaza. NO mediaza citotoxicitatea macrofagului, dependenta de L-arginina.

Una din cauzele primare ale patologiei maligne este *metastazarea*, adica eliberarea celulelor din situsul tumorii primare, pentru a initia la distanta, cresterea unei noi tumori. Celulele metastazate au aceleasi antigene de suprafata, ca si tumora primara. Principalele situsuri de metastazare sunt ganglionii limfatici, plamânul, ficatul.

În studiile experimentale, macrofagele activate s-au dovedit a fi foarte eficiente în reducerea incidentei metastazelor unor tumori.

Imunitatea mediata de celulele T

Imunitatea antitumorala mediata de celulele T, ca mecanism, este analoga raspunsului imun fata de alte antigene T-dependente (de exemplu, antigenele CMH). Experientele *in vitro* au evidentiat ca antigenele tumorale stimuleaza proliferarea tuturor subpopulatiilor de limfocite T (Th, Ts, Tc). Functiile efectoare ale limfocitelor T sunt stimulate de limfochine si monochine (IL-1 si TNF- α), sintetizate si secretate de macrofagele care prezinta antigenele tumorale solubile.

IL-1 stimuleaza proliferarea celulelor B, T si NK. IL-1 produce si raspunsul febril în reactia inflamatorie, iar TNF-α determina necroza celulelor tumorale.

Limfocitele TCD_4 (si NK) secreta IL-2, cu efect stimulator asupra celulelor care o secreta.

IFN γ este secretat de celulele TCD_4 (si NK) si activeaza macrofagele si celulele NK. Interferonul are efect antitumoral direct, dar este si imunomodulator.

Limfocitele Tc au rol important în liza celulelor tumorale, daca acestea exprima molecule CMH I. Interactiunea limfocitului Tc cu celula maligna este specifica. Limfotoxina produsa de limfocitul Tc are efect litic direct asupra celulelor tumorale.

Celula tumorala expune pe suprafata ei, antigene asociate cu moleculele CMH I, dar elimina si molecule solubile, care sunt preluate de CPA si prezentate limfocitelor Th. Acestea secreta IL-2, activatoare pentru toate tipurile de celule cu functie imunitara, specifica sau nespecifica.

În concluzie, reactia imuna fata de celulele tumorale are doua trepte. In prima etapa sunt activate *celulele efectoare nespecifice* (macrofage, eozinofile, neutrofile, celule NK) si se produce o reactie inflamatorie locala. Reactia nespecifica usureaza *reactia imuna specifica,* prin diminuarea ratei de crestere a tumorii si cresterea nivelului de prezentare a antigenelor tumorale de catre celulele maligne, prin modularea exprimarii moleculelor CMH. In faza a II-a, celulele Tc asigura protectia imuna fata de cresterea tumorii.

Celulele efectoare ale imunitatii mediate celular, specifica si nespecifica, sunt eficiente în detectarea si liza celulelor tumorale *izolate* si *transplantate*. Deoarece detecteaza celulele tumorale izolate, ele sunt eficiente în *prevenirea metastazelor*, dar sunt ineficiente fata de celulele care constituie o microtumora.

Mecanisme de scapare a celulelor tumorale

Antigenele tumorale se gasesc pe suprafata celulelor tumorale. Ele sunt antigene TSTA, mai concentrate sau mai diluate. Antigenele CMH normale nu dispar, dar diminua cantitativ.

Cresterea tumorilor, în conditiile activarii raspunsului imun, nu este explicata satisfacator. S-au propus mai multe mecanisme prin care celulele tumorale evita recunoasterea de catre efectorii raspunsului imun. Când sistemul imunitar este alertat, tesutul tumoral este prea dezvoltat si nu mai poate fi înlaturat.

De cele mai multe ori, *tumora nu este imunogena*. Lipsa imunogenitatii nu se datoreaza absentei antigenelor tumorale, ci faptului ca celulele tumorale nu sunt eficiente în prezentarea antigenului.

Cel mai surprinzator si cel mai studiat mecanism de evitare a raspunsului imun este *modularea antigenica.* Fenomenul modularii antigenice defineste capacitatea tumorii de a masca sau de pierde antigenele, în prezenta efectorilor imunitari. De exemplu, celulele leucemice transplantate la soarecele imunizat cu mojaratul celulelor leucemice care contin antigenul TL, au pierdut antigenul TL, dar antigenul reapare dupa transplantul celulelor leucemice la soarecii care nu au anticorpi serici anti-TL.

Imunoselectia. Antigenele exprimate pe suprafata celulelor tumorale activeaza raspunsul imun mediat celular, iar antigenele solubile stimuleaza sinteza anticorpilor. Unele celule tumorale, ca rezultat al instabilitatii genetice, pierd antigenele initiale si astfel evita efectorii raspunsului imun specific. Ele devin dominante în masa tumorii. Noile variante antigenice induc raspunsul imun specific, dar fenomenul schimbarii specificitatii antigenice se repeta. Raspunsul imun nu induce schimbarea specificitatii antigenice a suprafetei celulei maligne, ci selecteaza celulele care au suferit modificarea antigenica si astfel au devenit rezistente la actiunea efectorilor imunitari.

Diminuarea reactivitatii imunitare pe cale naturala sau artificiala este însotita de cresterea incidentei neoplaziilor. Imunosupresia naturala este mediata de limfocitele Ts. Antigenele tumorale par sa activeze mai usor celulele Ts decât limfocitele Th. Limfocitele Ts sunt mai numeroase la pacientii neoplazici si pot sa represeze raspunsul imun pâna la ineficienta totala.

Celulele tumorale secreta *citochine cu actiune imunosupresoare*, prin efectul lor inhibitor asupra interleuchinelor. Celulele maligne produc IL-10, detectata în lichidul peritoneal si în serul pacientelor cu cancer ovarian sau cu alte neoplasme intraperitoneale. IL-10 inhiba exprimarea

moleculelor CMH II pe suprafata monocitelor si macrofagelor si diminua reactivitatea imunitara prin efectele sale multiple asupra limfocitelor, monocitelor, celulelor NK si celulelor dendritice.

Reactivitatea imunitara poate sa diminue datorita *mascarii antigenelor tumorale*. De exemplu, sialomucina, abundenta pe suprafata celulelor unor tumori, mascheaza antigenele tumorale si le face inaccesibile recunoasterii imunitare si efectorilor imunitari. Sialomucina poate fi îndepartata, *in vitro*, prin tratamentul celulelor cu neuraminidaza de *Vibrio cholerae* si celulele îsi dobâdesc sensibilitatea la actiunea litica a efectorilor imunitari.

Diminuarea reactivitatii imunitare se poate datora inundarii organismului cu antigenele tumorii. Fiind o celula foarte activa din punct de vedere metabolic, componentele membranei sale au un turn-over ridicat. Antigenele eliberate se complexeaza cu anticorpii specifici sau cu receptorii specifici ai limfocitelor, facându-i ineficienti în recunoasterea celulelor maligne. Efectul imunosupresor al antigenelor tumorale este proportional cu dimensiunile tumorii si dependent de existenta metastazelor.

Efectul de *inundare* cu antigenele tumorii este argumentat de experientele de transplant tumoral. Numarul celulelor transplantate este determinant pentru dezvoltarea tumorii. Grefarea unui numar mic de celule (prin injectarea suspensiei) este urmata de respingere, iar grefarea unui numar mare de celule este urmata totdeauna de cresterea tumorii. Dupa ce organismul a respins un numar mic de celule maligne transplantate, se va apara fata de un numar progresiv crescând de celule de acelasi tip. Imunitatea de transplantare fata de antigenele tumorale poate fi depasita de un numar de 100-10 000 mai mare de celule tumorale, decât numarul de celule necesar grefei tumorii la animalele neimunizate.

Efectul imunosupresor al tumorii. Pacientii purtatori de tumori mari nu raspund la antigenele tumorale, iar limfocitele lor *in vitro*, au o slaba activitate citotoxica fata de celulele tumorale autologe.

Antigenele tumorale exercita un *efect imunosupresor* în gradient. La un situs îndepartat de tumora, efectul imunosupresor diminua si inoculul mic de celule tumorale este respins. Dupa ce tumora a dobândit dimensiuni importante, efectul imunosupresor este sistemic. Antigenele tumorale circulante se asociaza cu celulele efectoare ale sistemului imunitar, chiar în sângele circulant, producând paralizia raspunsului imun.

Cresterea tumorii poate fi stimulata prin fenomenul de *enhancement* imunitar. Fenomenul de enhancement, descoperit experimental, se defineste ca un proces de intensificare a cresterii

tumorii, în prezenta anticorpilor specifici. Tumorile au fost transplantate la organisme imunizate cu mojarat celular al aceleiasi tumori, pentru sinteza anticorpilor specifici. Anticorpii nu numai ca nu resping celulele grefate, ci determina un efect invers, de stimulare a cresterii tumorii, comparativ cu cresterea sa la animalele neimunizate. Anticorpii cu efect de enhancement sunt IgG, la titru mic.

Fenomenul de enhancement se explica astfel:

– anticorpii ar putea induce un efect imunosupresor, deoarece prin feed-back inhiba sinteza anticorpilor potential citolitici;

– anticorpii de enhancement sunt citofili, adica se leaga specific pe suprafata celulelor tumorale, formându-se complexe Ag-Ac, care blocheaza fizic atasarea efectorilor humorali sau celulari.

Evolutia tumorii este conditionata, într-o oarecare masura, de tipul anticorpilor care se sintetizeaza.

Toleranta imunitara este un mecanism eficient de scapare a celulelor tumorale de actiunea efectorilor sistemului imunitar. Toleranta se datoreaza lipsei de reactivitate a limfocitelor Tc si B, care la contactul cu antigenele tumorale nu se sensibilizeaza si nu genereaza raspunsul imun, desi fata de alte antigene, reactivitatea imunitara este normala. Toleranta survine datorita stimularii repetate cu cantitati mici de antigene, dar un rol esential în inducerea tolerantei imunitare pare sa revina raportului dintre limfocitele Th si Ts.

Diferite produse tumorale, altele decât antigenele, pot sa interfere cu functia imunitara si sa favorizeze instalarea tolerantei imunitare. De exemplu, prostaglandinele diminua nivelul exprimarii moleculelor CMH II pe suprafata celulelor prezentatoare de antigen si pot de asemenea sa suprime activitatea celulelor NK.

Factorii genetici, neidentificati, influenteaza evolutia tumorii. Unele neoplazii sunt asociate cu incapacitatea limfocitelor T de a activa raspunsul imun, probabil datorita incapacitatii lor de a recunoaste antigenul.

În concluzie, micile acumulari de celule tumorale, stimuleaza raspunsul imun. Dar, chiar tumorile imunogene continua sa creasca la gazdele imunocompetente, datorita eficientei scazute a raspunsului imun antitumoral *in vivo*. Tumorile evita actiunea distructiva a efectorilor imunitari sau blocheaza chiar raspunsul imun.

Abordari terapeutice ale neoplaziilor

Terapia neoplaziilor este abordata pe urmatoarele cai: chirurgicala, radioterapia, chimioterapia si imunoterapia. Oricare ar fi modalitatea de tratament, este necesara reducerea prealabila a masei

tumorale prin rejectie chirurgicala.

Terapia *chirurgicala* are ca scop reducerea dimensiunilor tumorilor solide, în stadiile timpurii ale neoplasmelor de sân, colon, plamân, prostata - cele 4 malignitati majore la om, ce reprezinta peste 50% din totalul tumorilor solide.

Radioterapia poate fi primara sau secundara. Cea primara se practica în cancerele capului, gâtului si în maladia Hodgkin (neoplazie a ganglionilor limfatici, din diferite regiuni ale corpului). Radioterapia este mai eficienta pentru tesuturile moi, în arii adiacente maxilarelor si cailor nazale. Iradierea totala se practica înainte de transplantul maduvei osoase si este foarte eficienta pentru anumite leucemii acute, refractare la chimioterapie si pentru tratamentul unor tumori solide (cancer de sân), care au revenit dupa câtiva ani de remisiune.

Chimioterapia consta în tratamentul cu medicamente citotoxice, majoritatea fiind produse de sinteza chimica. Scopul chimioterapiei este de a omorî selectiv celulele maligne, deoarece au o rata superioara de crestere si diviziune. Cele mai sensibile la chimioterapie sunt *leucemiile*. Efectul medicamentelor citotoxice este dependent de doza. Dozele prea mici nu produc efect, iar cele mari au efecte toxice asupra organismului, în special asupra maduvei osoase si asupra celulelor cu o rata mare de diviziune. Doza se calculeaza la aria de suprafata corporala, preferabila raportarii la greutate. Majoritatea agentilor citotoxici se administreaza intravenos, calea orala fiind adecvata pentru ciclofosfamida (si pentru tamoxifen).

Agentii chimioterapeutici, în functie de mecanismul actiunii lor, apartin mai multor clase.

Agentii alchilanti induc formarea legaturilor transversale stabile între cele doua catene ale AND (prin legarea de N_7 a guaninei) si inhiba replicarea moleculei de ADN. Interactiunea poate sa se produca cu una sau cu ambele catene ADN. Alchilarea guaninei induce împerecherea anormala cu timina sau depurinarea prin excizia resturilor de guanina. Consecinta este ruperea catenei de ADN. Daca legatura transversala se face între resturile de guanina ale celor doua catene, excizia reparatorie poate sa rupa molecula de ADN si sa rezulte o mutatie letala pentru celula. Agentii alchilanti reactioneaza chimic cu gruparile sulfhidril, amino, hidroxil si fosfat. Actiunea lor nu are specificitate de faza a ciclului celular, dar celulele sunt mai sensibile în faza G_1 si S. Efectul se manifesta prin blocarea ciclului celular dupa faza G_2.

Mecanismul rezistentei dobândite la agentii alchilanti poate sa conste într-o retentie scazuta a agentului în celula, în cresterea sintezei compusilor sulfhidril cu greutate mica si în cresterea capacitatii de reparare a leziunilor ADN. Desi au mecanisme asemanatoare de

actiune, diferentele structurii moleculare reduc gradul rezistentei încrucisate între compusii subclaselor majore. Efectele secundare sunt gastrointestinale (greata, voma) si hematologice (mielosupresie).

Ciclofosfamida este cel mai folosit agent alchilant, în tratamentul malignitatilor hematologice si a tumorilor solide. Este convertita la forma activa în ficat

Compusii platinei (cisplatin, carboplatin) nu sunt agenti alchilanti, dar actioneaza printr-un mecanism similar, adica se leaga de N_7 al guaninei si realizeaza legarea încrucisata a catenelor de ADN. Se leaga si cu alte molecule: adenina, citozina, ARN, proteine.

Antimetabolitii (citarabina, fluorouracil, metotrexat, mercaptopurina, hidroxiureea) sunt analogi ai bazelor azotate si inhiba sinteza ADN, ARN sau sinteza proteinelor. Sunt agenti cu specificitate de faza a ciclului celular.

Antagonistii pirimidinelor. Citarabina (Ara-C) este un compus cu specificitate de faza S. Este metabolizata în celula la forma activa, ara-CTP, inhibitor al ADN-polimerazei si al sintezei ADN. Ara-C este încorporata în ADN si blocheaza alungirea catenei, ca si legarea fragmentelor în molecula de ADN nou sintetizata.

Antagonistii purinelor. *6-mercaptopurina si 6-tioguanina* sunt convertite la forma nucleotidica de *h*ipoxantin-*g*uanin *f*osforibozil *t*ransferaza (HGPRT). Metabolitii lor inhiba unele enzime ale caii purinice. Unii metaboliti ai 6-tioguaninei sunt încorporati în ADN si în ARN.

Fludarabina este analog al adeninei. Derivatul sau, fludarabin-trifosfat, actioneaza prin inhibitia ADN-polimerazei si ribonucleotid-reductazei si prin încorporarea în ADN

Antagonistii acidului folic (metotrexat, aminopterina) sunt analogi structurali ai acidului folic.

Alcaloizii din plante (vincristina si vinblastina, izolati din *Vinca rosea*), produc agregarea tubulinei si dezorganizarea microtubulilor celulari. *Vinblastina* este toxica pentru maduva hematopoetica, iar *vincristina* are efecte toxice majore asupra terminatiilor nervoase periferice, producând neuropatii senzoriale (parestezie, adica lipsa senzatiei de durere) si motorii, în degete.

Pentru un numar mare de categorii de tumori, chimioterapia determina o citoreducere importanta. Dar, la câteva luni sau la câtiva ani, cresterea tumorala este reluata si continua chiar în conditiile reinstituirii tratamentului. Cresterea reflecta dobândirea *rezistentei* specifice la medicamentele administrate.

În general, dezvoltarea rezistentei la un medicament este

considerata ca rezultat al unei rate înalte a mutatiilor celulelor maligne, consecinta fiind aparitia unor subpopulatii heterogene, din care unele sunt rezistente la diferite medicamente. Cea mai importanta mutanta este cea cu *rezistenta medicamentoasa multipla*, mediata de *glicoproteina P,* o glicoproteina membranara, care functioneaza ca o *pompa de eflux*, dependenta de energie. Pompa elimina activ din celula, o varietate de agenti citotoxici: alcaloizii din plante, antibioticele (dactinomicina, doxorubicina, daunorubicina) si unii agenti sintetici (melphalan). Celulele maligne mutante, care exprima gena codificatoare a glicoproteinei P, sunt rezistente la o larga varietate de medicamente anticanceroase.

Imunoterapia încearca sa distruga celulele maligne, prin manipulari de stimulare a reactivitatii a sistemului imunitar.

Injectarea citochinelor sau stimularea *in vitro,* cu IL-2, a limfocitelor autologe, obtinute din sângele pacientului, are efecte stimulatoare asupra raspunsului imun. Rareori s-a produs remisiunea completa a neuroblastomului, a carcinomului renal sau a melanomului malign, ceea ce evidentiaza ca raspunsul imun fata de aceste neoplazii poate fi stimulat.

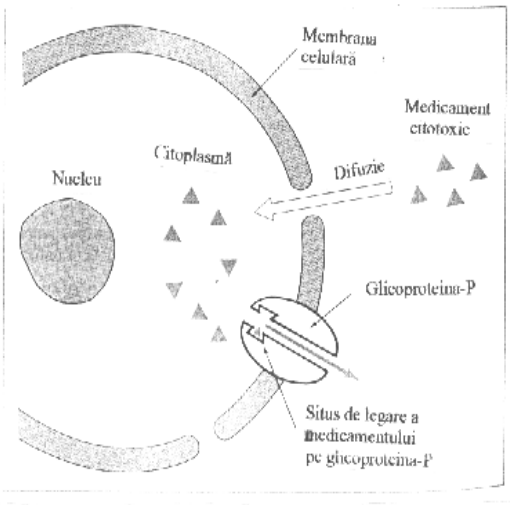


Fig. 134. Modelul unei *celule maligne care exprima glico-proteina P*, o proteina transmembranara care functio-neaza ca o *pompa de eflux*. Ea are situsuri acceptoare la care se leaga diferite medicamente anti-canceroase (naturale sau artifi-ciale), dupa care sunt pompate la exteriorul celulei. Functia glico-proteinei P poate fi inhibata competitiv de agenti chimio- sensibilizatori ca verapamil.

Cea mai obisnuita forma de terapie imuna a neoplaziilor este utilizarea anticorpilor monoclonali (AMC) cu specificitate tumorala, cuplati cu toxine (toxina difterica, toxina de ricin) sau cuplati cu agenti chimici (I^{131}, medicamente citotoxice), ce suprima proliferarea celulara. In ansamblu, terapia cu AMC nu a reusit. Cele mai frecvente tumori (de colon, de sân, de plamân, de prostata) poarta antigene proteice intracelulare, inaccesibile AMC. Strategiile chimioterapeutice au progresat mult si ofera mai multe sanse de reusita, la un pret de cost inferior.

În tratamentul limfoamelor celulelor B se folosesc AMC anti-idiotipici fata de imunoglobulina membranara a limfomului.

Stimularea nespecifica a tesutului limfoid este o metoda terapeutica introdusa de G. Mathé. El a administrat BCG pentru terapia leucemiilor limfoblastice la copii. Remisiunile se prelungesc ca durata. Celulele de *Corynebacterium parvum* au efecte antitumorale, în asociere cu chimioterapia, iar celule de *C. parvum* si BCG injectate direct în masa tumorii, inhiba cresterea tumorii. Antigenele bacteriene stimuleaza imunitatea mediata celular. Celulele limfoide sunt atrase în numar mare la locul injectarii si actiunea lor este orientata asupra celulelor tumorale. Macrofagele se activeaza la contactul cu antigenele bacteriene si dobândesc proprietati citotoxice fata de celulele tumorale, evidentiate *in vitro*.

Interferonul α (produs de leucocite) se utilizeaza în tratamentul unor leucemii si în tratamentul limfoamelor, dar este toxic, ceea ce impune limitarea dozei. Majoritatea pacientilor, dupa administrarea interferonului, fac un “sindrom al starii gripale”: febra, senzatie de frig, dureri de cap, dureri musculare. Aceste simptome diminua pe parcursul terapiei si sunt controlate, partial, cu diferiti agenti farmacologici.

Imunoprofilaxia cu vaccinuri, pentru anumite virusuri, a avut succes la animale. Boala lui Marek, produsa de un herpesvirus, este o maladie limfoproliferativa la puii de gaina. Incidenta leucemiei felinelor a scazut, ca rezultat al unui program de vaccinare. Nu exista vaccinuri protectoare fata de neoplaziile umane.

Capitolul 11

IMUNITATEA ÎN TRANSPLANTUL DE TESUTURI SI ORGANE

Chirurgia transplantului a depasit dificultatile de ordin tehnic. Reusita transplantului depinde exclusiv de reactivitatea imunitara, care declanseaza un raspuns de respingere.

Ideia înlocuirii unui organ lezat, cu unul sanatos, a preocupat medicina din timpuri foarte îndepartate. În mitologia greaca se vorbea de *organisme himere*, pastrate si astazi în reprezentarile sculpturale sub forma monstrilor fabulosi, a caror origine sugereaza o tripla heterografa: leu-capra-coada de dragon sau leu-capra-sarpe. Combinatia este interpretata ca o materializare pe plan abstract, a ideii de a asocia organisme foarte diferite. Sirenele (jumatate femeie-jumatate peste) si minotaurii (jumatate om, jumatate taur) exprimau ideia de asociere a acestor organisme foarte diferite.

Perioada stiintifica a transplantului începe cu Alexis Carrel (medic american, care a lucrat în Franta, autorul lucrarii "Omul – fiinta necunoscuta"), cel care a pus bazele cultivarii celulelor si tesuturilor. In 1902, Carrel a facut grefe de rinichi la animale. In 1906, a grefat plamâni la pisica si a facut primul transplant de inima la câine, legând inima de vasele regiunii cervicale. Animalul a trait 21 de ore.

K. Landsteiner, unul din promotorii perioadei stiintifice, a descris grupele sanguine si conditiile de compatibilitate majora între donor si receptor. In 1944, Medawar a conchis ca respingerea grefelor de tesuturi si organe are cauze imunitare, iar curând dupa aceea, Billingham, Brent si Medawar au descris fenomenul de *toleranta imunitara*.

G. Mathé (hematolog francez) a creat *himerele biologice*. El a pornit de la ideia ca fenomenele de respingere a grefelor de tesuturi si organe sunt datorate stimularii activitatii sistemului imunitar. In lucrarile sale experimentale, a recurs la metoda *paralizarii reactivitatii imunitare*. In acest scop, puii nou-nascuti de sobolan au fost supusi iradierii totale, cu doza de 800 de razi. Rezultatul iradierii este desfiintarea barierelor imunitare, adica anihilarea reactivitatii imunitare fata de grefa. La animalele iradiate a inoculat câteva milioane de celule din maduva osoasa de soarece. Autorul a creat astfel, *himera biologica* soarece-sobolan (sobolan cu elemente figurate sanguine de soarece).

Himera este sensibila la infectia cu virusul leucemiei soarecelui si face leucemia, în timp ce sobolanii conventionali sunt rezistenti la infectia cu acest virus.

Himera biologica este orice organism dotat în mod artificial cu componente celulare, cu tesuturi sau organe, care provin de la alte organisme. Ulterior, tehnicile de inginerie genetica au creat molecule de ADN himere si chiar microorganisme himere, ce poarta informatie genetica provenita de la doua specii diferite.

În 1967, Christian Barnard a realizat primul transplant de cord la om.

Denumirea de grefa, folosita curent pentru tesutul implantat în organismul strain, vine de cuvântul grecesc *grafion*, care desemneaza un instrument de scriere prin gravura. Denumirea a fost ulterior folosita cu întelesul de *altoi* la plante. Denumirea de *transplant* a fost folosita de Paracelsus si înseamna *a transfera, a muta*.

Notiunea de transplant are un sens mai larg. Ea include fecundarea ovulului de catre spermatozoid, ca transplant natural. Fatul este o alografa naturala, ce poarta informatia genetica de origine paterna, dar este protejat prin mecanisme cu actiune placentara, de fenomenele de respingere.

Terminologie. Terminologia moderna referitoare la grefa are trei origini: chirurgicala, imunologica si genetica. Uniformizarea ei a fost ceruta de OMS.

Relatia genetica si antigenica între organismul donor si receptor	Tipul de grefa (Denumire noua)	Denumire veche	Tipul de tesut	Observatii
Identitate Individul este donor cât si receptor	**Autografa**	Grefa autologa (autohtona, autogena)	Tesut autogenic	atât
Identitate *Organisme*	**Singrefa**	Izografa	Tesut singenic	
identice ale unei linii inbred. Pentru om, gemeni uni-	(Homografa singenica)	(Grefa izogena Grefa izologa)	(congenic)	vitelini.

Diferite altul	**Alografa**	Grefa homologa	Tesut	*Allos* =
Organisme ale	(Homografa			alogenic
aceleiasi specii	a l o g e n i c a)			
variante				dar cu
diferite.				a l e l i c e
Foarte diferite = strain	**Xenografa**	Heterografa	Tesut	*Xenos*
apartin		(Grefa heterologa)	xenogenic	Indivzii
specii				u n o r
(câine-				diferite
				iepure).

Autografele se practica cu o frecventa mare: în cazuri de arsuri, interventii chirurgicale estetice. Pielea dintr-o regiune a corpului este implantata într-o zona compromisa.

Alte denumiri se refera la particularitatile tesutului transplantat:

– grefele homovitale se fac pentru asigurarea viabilitatii tesutului transplantat

– grefele homostatice sunt acelea în care tesutul grefat are rolul numai de suport structural, pe care se poate dezvolta tesutul gazdei, pentru restabilirea arhitecturii initiale. Astfel de grefe sunt lipsite de orice urma de tesut antigenic, se practica pentru a înlocui un fragment de vas sau de os.

În raport cu locul de unde tesutul a fost luat si locul unde se reimplanteaza, se disting grefe *ortotopice* (tesutul grefat este asezat la receptor în aceiasi pozitie) si grefe *heterotopice* (tesutul grefat este implantat în alt situs anatomic al organismului receptor).

Dupa 1956, primul succes al grefei de rinichi între gemeni univitelini, transplantul de organe a devenit o practica curenta. Interesul pentru transplant s-a deplasat de la actul chirurgical, la aspectele imunologice.

Argumente ale rolului reactivitatii imunitare în respingerea grefei

Respingerea grefei este rezultatul activarii mecanismelor imunitare, datorita diferentelor antigenice între moleculele CMH I si II ale

donorului si receptorului. In favoarea acestei afirmatii argumenteaza mai multe fapte de observatie:

– autogrefele si singrefele sunt acceptate totdeauna, daca sunt respectate conditiile de asepsie;

– grefa între indivizi diferiti este respinsa cu atât mai brutal, cu cât diferentele antigenice(biochimice) dintre moleculele CMH ale donorului si receptorului sunt mai mari;

D	**R**		
A ----------	A -----	O	Grefa *prinde.*
B ----------	A ----	0	Grefa este *respinsa,* pentru ca organismele difera prin moleculele CMH.
B ----------	AxB ----	O	Grefa este *acceptata.* Capacitatea de a accepta o grefa depinde de existenta la organismul receptor, a tuturor genelor de histocompatibilitate ale donorului. Daca receptorul are un antigen suplimentar, grefa este acceptata.
AxB ----------	B ------	0	Daca donorul poseda un antigen suplimentar fata de receptor, grefa este *respinsa.*

– din punct de vedere histologic, tesutul grefat respins este infiltrat cu celule efectoare ale raspunsului imun: limfocite, macrofage, plasmocite;

– animalele timetomizate au o capacitate scazuta de respingere a grefelor de tesuturi si organe, care se restabileste dupa grefarea timusului;

– debutul fenomenelor de respingere este foarte mult întârziat, daca organismului receptor de grefa i se administreaza *ser antilimfocitar* (SAL);

– fenomenele de respingere sunt mai intense la copii, datorita abundentei tesutului limfoid, dar sunt mult atenuate la batrâni.

Argumente indirecte în favoarea respingerii imunitare:

– organele grefate rapid dupa recoltare sunt suportate mult mai bine decât cele care au fost pastrate o perioada mai lunga de timp în afara organismului. Tesutul transplantat dupa o perioada de pastrare, contine mai multe celule lezate si lizate, din care se elibereaza molecule nonself, care amplifica raspunsul imun;

– conservarea în conditii optime mareste gradul de toleranta fata de tesutul grefat, iar pastrarea neadecvata are efecte defavorabile;

– organele si tesuturile sanatoase sunt tolerate mai bine decât cele

care prezinta o stare de uzura biologica.

Evolutia respingerii grefei de piele

În raport cu dinamica desfasurarii, se disting trei modalitati de respingere a grefei de piele.

Respingerea acuta sau *hiperacuta* este foarte rar întâlnita si se datoreaza incompatibilitatii totale între donor si receptor, care nu apartin aceluiasi grup sanguin în sistemul ABO. In organismul receptor de grefa, exista anticorpi circulanti preformati (aglutininele α si β) fata de antigenele tesutului transplantat. Lor li se adauga efectele imediate produse de macrofagele si neutrofilele activate, de anafilatoxinele eliberate din fixarea complementului. Vasele din organul grefat se obtureaza prin formarea trombilor de coagulare. Grefa nu se vascularizeaza, ramâne alba si în câteva ore este respinsa.

Respingerea dupa dinamica raspunsului imun primar survine în cazul în care, între donor si receptor este o incompatibilitate relativa. Grefa se vascularizeaza, dobândeste o culoare normala (roza), dar dupa 10-12 zile, culoarea se închide, devine purpurie, apar fenomene de respingere si grefa este eliminata.

Respingerea dupa dinamica raspunsului imun secundar este de tip accelerat si are loc la organismele la care grefa s-a repetat dupa o alta grefa cu tesut de la acelasi organism donor sau de la un organism al aceleiasi linii inbred. Raspunsul este accelerat, în sensul ca fenomenele de infiltratie cu macrofage, neutrofile si limfocite T sensibilizate, se produc foarte repede si în 3-4 zile, grefa este respinsa.

Respingerea grefei de rinichi

Respingerea hiperacuta se produce foarte repede dupa ce s-au stabilit conexiunile vasculare cu organul grefat si se datoreaza incompatibilitatii totale între donor si receptor, care nu apartin aceluiasi grup sanguin în sistemul ABO. In primele ore dupa stabilirea conexiunilor vasculare se produce încetinirea fluxului sanguin, urmata de o staza circulatorie în organul grefat. Rinichiul se încarca cu o cantitate mare de sânge si dobândeste culoarea rosie, fenomen denumit *hepatizare*. Oprirea circulatiei sanguine initiaza procesul de coagulare la nivelul capilarelor sanguine.

Cauzele respingerii hiperacute. In sângele organismului receptor se gasesc *anticorpi preformati* (aglutinine), specifici fata de antigenele din organul grefat. Antigenele de grup sanguin în sistemul ABO se

gasesc nu numai pe *eritrocite*, ci si pe *celulele endoteliale* ale capilarelor sanguine. *Aglutininele* α *si* β ale receptorului de grefa ajung în rinichiul grefat imediat dupa realizarea anastomozelor vasculare. Se formeaza complexe antigen-anticorp care initiaza fixarea complementului. Endoteliul capilar sufera mici leziuni, suficiente pentru a determina aparitia suprafetelor rugoase, de care adera PMNN. La acest nivel, celulele endoteliale exprima *selectinele*, prin intermediul carora leucocitele adera de endoteliu si parasesc circulatia. La nivelul suprafetei rugoase se acumuleaza trombocitele, care se agrega treptat si împreuna cu factorii plasmatici, formeaza trombi care obtureaza lumenul capilar. În 48 de ore, arteriolele si capilarele se trombozeaza.

Respingerea hiperacuta este o reactie de *activare endoteliala* si grefa este respinsa ca o xenografa. Pentru a elimina anticorpii naturali, se practica plasmafereza sângelui receptorului si absorbtia anticorpilor pe coloana. Complementul este eliminat prin administrarea veninului de cobra.

Respingerea acuta se produce în doua variante dinamice:

– respingerea acuta precoce, în 10-14 zile de la transplantare

– respingerea acuta tardiva, în circa 4 luni.

Dupa grefarea tesutului, o parte a antigenelor tisulare se elibereaza din rinichi si trec în circulatie, ajungând în ganglionii limfatici regionali.

Antigenele declansatoare ale respingerii grefei

Moleculele CMH ale tesutului grefat stimuleaza un raspuns imun intens al organismului receptor, a carui finalitate este respingerea grefei. Moleculele CMH I se gasesc pe toate celulele nucleate, dar au un nivel variabil de exprimare. Moleculele CMH II au o distributie limitata: pe macrofage, pe limfocitele B, pe unele celule epiteliale si endoteliale, pe celulele dendritice. Nivelul de exprimare a moleculelor CMH I si II este modulat de citochine (IFN γ si TNF α). Polimorfismul extensiv al moleculelor CMH limiteaza posibilitatea transplantului numai între parteneri compatibili CMH. Chiar în aceste conditii, grefa poate fi respinsa, datorita diferentelor între antigenele minore ale donorului si receptorului.

Antigenele din grefa au urmatoarele origini:

– antigenele libere (antigene “solubile”) provin din liza eritrocitelor si din membrana bazala;

– antigenele CMH exprimate pe celulele dendritice existente în tesutul grefat;

– antigene CMH asociate membranelor rezultate din liza celulelor

organului, în perioada de conservare.

Antigenele CMH ale donorului pot fi recunoscute pe suprafata celulelor prezentatoare (prezentare directa) sau ca fragmente prelucrate si asociate cu moleculele CMH ale receptorului (prezentare indirecta).

Antigenele eliberate din grefa, ajung în ganglionii regionali ai gazdei si activeaza limfocitele T si B. Cele mai importante antigene aduse de organul grefat, cu rol esential în declansarea conflictului imun, sunt *moleculele CMH I si II*. Un rol deosebit se atribuie *celulelor dendritice* din tesutul grefat. Ele exprima molecule CMH II la densitate foarte înalta, care determina stimularea initiala a limfocitelor gazdei.

Moleculele CMH I si II libere se comporta ca *antigene tari*, intens imunogene si nu necesita prezentarea în asociatie cu moleculele CMH proprii organismului, pentru a stimula limfocitele T, dar sunt mult mai imunogene daca sunt prezentate de alte celule, în special de celulele dendritice si de celulele endoteliale.

Raspunsul imun fata de tesutul grefat este mediat în primul rând de *limfocitele T.* Ca dovada, soarecii atimici (nuzi) nu resping grefele alogenice de piele si tolereaza chiar grefe xenogenice.

La examenul histologic al unei grefe de piele, în cursul respingerii, se observa *infiltratul* cu mononucleare, multe fiind limfocite. Acumularea lor în tesutul grefat precede respingerea, care survine în câteva zile. In organul grefat, raportul dintre limfocitele TCD_4 si TCD_8 este 1/3, adica predomina net limfocitele Tc, iar în mod normal, acest raport este 2/1.

Limfocitele T stimulate de antigenele CMH sintetizeaza interferon γ, activator al macofagelor din focarul conflictului. Macrofagele devin citotoxice fata de tesutul grefat, ca si limfocitele Tc.

Macrofagele secreta IL-1, care produce *febra* ce însoteste reactia de respingere a grefei. Limfocitele patrunse în tesutul grefat sunt pasagere. Ele parasesc grefa, trec în limfa si ajung în ganglioni, unde începe proliferarea, elibereaza citochine, care activeaza limfocitele ganglionare. Acestea devin limfocite efectoare.

Celulele NK nu necesita activarea prealabila pentru a liza diferite celule tumorale. Ele sunt implicate în respingerea alogrefelor de organe.

Capacitatea de a respinge grefa poate fi usor transferata prin intermediul limfocitelor de la organismul imunizat prin contactul anterior cu antigenele grefei. Surprinzator, în tesutul grefat nu migreaza limfocitele transferate, ci migreaza limfocitele organismului gazda, activate de IL secretate de limfocitele transferate.

Rolul anticorpilor. Ca raspuns fata de antigenele tesutului grefat, se sintetizeaza anticorpi specifici fata de antigenele de transplantare. Anticorpii au rol secundar în reactia de respingere a grefelor de tesuturi

si organe. Anticorpii au rol foarte important în respingerea grefei, în situatiile în care, anticorpii anti-CMH preexista la un titru crescut în momentul transplantarii. Sinteza lor este indusa de sarcinile multiple, de transfuzii repetate sau de o grefa anterioara. Grefa este respinsa imediat.

Anticorpii au rol important în respingerea grefelor cu incompatibilitate grava între donor si receptor, deoarece fixeaza complementul si produc fenomenul de *citoliza*. Daca nu fixeaza complementul, anticorpii au rol de *opsonine*, adica sensibilizeaza celulele grefate fata de actiunea macrofagelor si neutrofilelor. Anticorpii sintetizati în tesutul grefat, determina eliberarea mediatorilor reactiei de hipersensibilitate imediata (de exemplu, histamina), care produc modificari circulatorii în vasele grefei.

Anticorpii fata de antigenele eritrocitare sunt singurii efectori imunitari eficienti în transfuzia incompatibila. Efectul lor consta în aglutinarea si liza eritrocitelor.

Dupa grefarea unui organ sanatos într-un organism uzat, din punct de vedere functional, organul grefat se aliniaza repede la starea generala de uzura a gazdei.

Transplantarea maduvei osoase se realizeaza pentru tratamentul pacientilor cu maladii imunodeficitare, anemie aplazica severa, leucemie, limfom, iar mai recent, pentru dezordinile hematopoetice cu substrat genetic.

La pacientii imunodeficitari, transplantul maduvei osoase este destinat sa furnizeze *celule stem* pentru a restabili sistemul imunitar al receptorului, fara sa înlocuiasca în mod necesar compartimentul mieloid. Datorita starii nefunctionale a sistemului imunitar, transplantul maduvei osoase poate fi facut fara tratamentul imunosupresor al gazdei.

Maduva este recoltata prin aspiratie din crestele iliace anterioare si posterioare, de la donorul anesteziat. Amestecul de maduva osoasa si sânge este plasat în mediu de cultivare cu heparina, într-o punga hematologica si se administreaza fara întârziere organismului receptor, prin infuzie intravenoasa, în cantitatea de 2×10^8 - 6×10^8 celule medulare/kg. Infuzia se face la 1-24 ore dupa ultima iradiere totala a corpului sau la 36 de ore dupa ultima doza de ciclofosfamida. Celulele stem circula în sânge, însamânteaza cavitatea medulara si încep sa se divida. În 2-4 saptamâni, creste populatia celulara a maduvei si în acelasi timp creste numarul celulelor sanguine periferice. La donor, maduva se reface repede.

Prevenirea respingerii grefelor de organe este posibila printr-o împerechere cât mai adecvata a donorului si receptorului din punctul de vedere al asemanarii moleculelor CMH si, ulterior, prin instituirea

tratamentului imunosupresor. Dar, spre deosebire de alte celule, cele din maduva osoasa sunt foarte antigenice (au o mare densitate a moleculelor CMH I) si din aceasta cauza, receptorul trebuie sa fie supus unui tratament radio-chimioterapeutic intens, pâna la limita suportabilitatii, pentru ca transplantul de maduva sa aiba succes. Chiar astfel, la pacientii leucemici, respingerea maduvei osoase poate sa aiba loc, în cazul unei împerecheri antigenice neadecvate.

Transplantul de maduva osoasa ridica o problema speciala: celulele transplantate fiind imunocompetente, pot sa initieze reactia "grefa contra gazda", fata de antigenele receptorului. Reactia este initiata fata de antigenele tegumentare, ale ficatului si intestinului si este letala la 10-15% dintre receptorii de maduva osoasa cu molecule HLA identice si la 40% dintre receptorii cu molecule HLA neidentice.

Teste de histocompatibilitate

În transplantul de tesuturi si organe, esentiala este asemanarea cât mai accentuata a moleculelor CMH ale donorului si receptorului. Pentru testul gradului de asemanare, se analizeaza comportamentul limfocitelor celor doi parteneri, *în amestec* (reactia de amestec limfocitar, RAL). Testul evidentiaza diferentele antigenice dintre donor si receptor, în ceea ce priveste moleculele CMH II. Pentru reusita grefei, este obligatorie identitatea acestor molecule. Perechea donor-receptor care produce cel mai usor raspuns în RAL, ofera cea mai buna sansa de acceptare a grefei.

Cel mai adesea se folosesc limfocitele din sânge. Celulele trebuie sa fie viabile si în mediu se adauga ser de vitel (1-10%) si 2-mercaptoetanol. Limfocitele donorului se cultiva în amestec cu limfocitele receptorului, în prezenta timidinei H^3. Se masoara nivelul radioactivitatii limfocitelor, consecutiv încorporarii timidinei H^3 pentru sinteza ADN. RAL reflecta raspunsul proliferativ al celulelor T, cu putine sau fara celule B. Transformarea blastica nu se produce în RAL a gemenilor monozigoti. Intr-un amestec celular $a \times b + a \times c$, raspunsul este *bidirectional*. Cea mai ampla reactie are loc între limfocitele care se deosebesc prin moleculele CMH. Cel mai puternic stimul în RAL îl reprezinta aloantigenele CMH II, cu un polimorfism foarte înalt, iar aloantigenele clasa I au un rol stimulator limitat. Moleculele CMH II se gasesc pe limfocitele B, pe macrofage, pe celulele dendritice, iar pe limfocitele T, numai dupa activare. Se pare ca raspunsul în RAL nu este orientat fata de epitopii CMH propriu-zisi, ci fata de o larga varietate de peptide self legate de moleculele CMH, rezultate probabil prin

degradarea diferitelor proteine celulare. Dat fiind polimorfismul deosebit al moleculelor CMH, probabil ca marea majoritate a limfocitelor T din amestec manifesta aloreactivitate fata de cel putin unul din aloantigenele CMH ale speciei.

Pentru raspunsul *unidirectional*, una din cele doua populatii celulare (de obicei a donorului) se inactiveaza prin tratament cu mitomicina C (pentru inhibitia sintezei ADN) sau se supun iradierii.

Tratamentul inactiveaza celulele T, dar nu interfera cu imunogenitatea lor. In RAL se activeaza numai limfocitele receptorului de grefa, ca raspuns la aloantigenele donorului.

În cazul grefei unui organ imunocompetent la o gazda imunodeficitara, în RAL se inactiveaza limfocitele receptorului, pentru a evalua reactivitatea limfocitelor donorului, care ar putea initia o reactie grefa contra gazda.

Compatibilitatea donor-receptor pentru antigenele CMH I se testeaza cu *seruri imune* anti- CMH I. Se analizeaza reactia limfocitelor celor doi parteneri, fata de un numar cât mai mare de seruri anti CMH I. In laboratorul de profil exista seturi de seruri anti-CMH I, recoltate de la persoane care au o bogata experienta antigenica HLA:

– persoane care suferit transfuzii sanguine multiple si astfel s-au imunizat fata de antigenele HLA;

– femei multipare, care au avut sarcini multiple cu parteneri diferiti.

Serurile anti-CMH se pun în contact cu limfocitele donorului si cu ale receptorului de grefa. Anticorpii anti-CMH se fixeaza pe suprafata limfocitelor si astfel este initiata transformarea blastica. Se determina un *coeficient de reactivitate* (coeficient de transformare blastica), pe baza numarului de limfocite transformate.

Daca limfocitele donorului si receptorului se comporta asemanator fata de un numar mare de seruri, concluzia este ca cele doua populatii de limfocite sunt asemanatoare.

Daca titrul anticorpilor anti-CMH în ser este crescut, se poate produce nu numai activarea limfocitelor, ci chiar aglutinarea imuna sau, dupa fixarea complementului, citoliza.

Xenotransplantarea

Termenul semnifica transplantul de tesuturi si organe între organismele unor *specii diferite*. Interesul clinic pentru xenotransplantare a fost determinat de lipsa organelor umane. Succesul alotransplantului a creat un necesar care depaseste disponibilul. In 1963, transplantul de rinichi de cimpanzeu la om, a prelungit supravietuirea cu 9 luni si moartea a survenit dupa complicatiile

provocate de imunosupresie. In 1984, inima de babuin a fost transplantata la om. A urmat transplantul de ficat de maimuta, transplantul de celule neurale de embrion de porc, la un pacient cu boala Parkinson, transplantul de maduva osoasa de la babuin, la un pacient cu SIDA.

Barierele xenotransplantarii sunt multiple: unele organe de la alte specii nu functioneaza adecvat în noul mediu. Rinichiul de cimpanzeu este functional în organismul uman. Persoanele transplantate cu rinichi de porc devin anemice, probabil pentru ca eritropoetina nu este activa, iar cele cu ficat de babuin au nivele mai mici de colesterol (echivalente cu cele de babuin) si nivele foarte scazute de acid uric (pentru ca ficatul de babuin nu produce acid uric). Grefarea celulelor sanguine stem xenogenice este limitata de absenta factorului de crestere specific celulelor stem transplantate.

Xenografele pot fi *neconcordante* (de la porc) sau *concordante* (de la cimpanzeu, babuin). La perechile neconcordante, titrul *anticorpilor preformat*i este detectabil si xenografele sunt respinse *hiperacut* (în câteva minute), prin *reactia de activare a endoteliului*. Pentru respingerea hiperacuta a grefelor neconcordante, un alt factor critic (alaturi de anticorpii preformati) al producerii leziunilor endoteliale este *complementul si proteinele sale reglatoare*. In combinatia porc-om, anticorpii preformati se leaga la nivelul determinantilor antigenici de *galactoza* α *(1,3)-galactoza* ai endoteliului grefei, deoarece omul a pierdut gena pentru enzima alfa-galactozil-transferaza si nu poseda acest epitop. Activarea complementului se face pe calea clasica, iar în absenta anticorpilor preformati, pe calea alterna. In esenta, respingerea hiperacuta se datoreaza *reactiei endoteliale* la activarea complementului, mediata de anticorpii preformati (IgG anti-α-gal).

Incompatibilitatea combinatiei porc-om se datoreaza faptului ca porcul exprima un nou *antigen de grup sanguin,* α*-gal(gal-*α *1,3-gal)* (la om, specificitatea antigenica a grupului 0 este conferita de *L-fucoza*, a grupuluiA, de *N-acetil-galactozamina, galactoza si L-fucoza*, iar a grupului B, de *D-galactoza si L-fucoza*). α-gal nu este singurul determinant recunoscut de anticorpii naturali umani. Alte heteroantigene pot deveni importante, dupa transplantul organului. Anticorpii xenoreactivi, specifici fata de epitopii α 1,3-gal si complementul sunt factorii majori ai respingerii hiperacute.

Tinta respingerii hiperacute este *endoteliul vascular*. Activarea endoteliului produce cele mai evidente manifestari ale respingerii hiperacute: tromboza intravasculara, hemoragia extravasculara si edemul.

În asocierile concordante, titrul anticorpilor preformati nu este

detectabil si respinerea este *acuta*, datorita aceluiasi fenomen de *activare a endoteliului* vascular.

Respingerea întârziata (acuta) a xenografelor concordante se face în 2-3 zile (mult mai repede decât a alografelor). Din punct de vedere histologic, respingerea acuta releva mai putina hemoragie, dar cu tromboza intravasculara semnificativa, ca si în reactia hiperacuta, deoarece tinta este endoteliul vascular. Respingerea acuta a xenografei se datoreaza anticorpilor a caror sinteza este indusa de antigenele xenografei. Se sintetizeaza preponderent IgG anti-α-gal, al caror titru creste rapid.

Progresul în xenotransplantare s-a facut în sensul prevenirii respingerii hiperacute: imunosupresia receptorului de grefa si ingineria genica a donorului pentru a elimina marile diferente antigenice dintre xenografe si alografe. La soarece s-a reusit eliminarea genei galactozil-transferazei prin recombinare homologa, dar tehnologia nu este adecvata pentru alte specii. Eliminarea antigenului α-gal, expune un nou determinant glucidic, fata de care omul are un nivel scazut de anticorpi preformati.

Imunosupresia

Variantele alelice multiple codificatoare ale moleculelor CMH fac cu totul improbabila posibilitatea ca doua organisme sa fie identice pentru moleculele CMH, cu exceptia gemenilor monozigoti. Natura determinismului genetic al moleculelor CMH nu este favorabila transplantului de tesuturi si organe. Amplitudinea procesului de respingere a grefei este partial dependenta de gradul de incompatibilitate al antigenelor CMH, dintre donor si receptor.

Scopul imunosupresiei selective este de a mentine functionalitatea mecanismelor de aparare a organismului, fata de infectiile virale, bacteriene, fungice si fata de paraziti, de a pastra capacitatea SFM de a fagocita celulele îmbatrânite si de a proteja mecanismele de imunosupraveghere care elimina celulele maligne. Pe de alta parte, se urmareste inducerea starii de toleranta fata de antigenele organului grefat (rinichi, ficat, inima). În cazul maladiilor autoimune, dezideratul imunosupesiei este inhibitia selectiva a reactivitatii imunitare autoagresive fata de antigenele retinei (în uveita)sau fata de antigenele colonului (în boala Crohn).

Un medicament imunosupresor trebuie sa întruneasca urmatoarele criterii:

– sa *inhibe activarea raspunsului imun* si sa fie eficient fata de

procesele imunitare în curs de desfasurare;

– sa aiba *actiune selectiva*, adica sa produca deletia clonala sau sa inactiveze numai anumite subpopulatii de celule imunocompetente;

– sa aiba un *index terapeutic* bun, adica un raport favorabil între doza terapeutica si cea toxica.

Pentru supravietuirea grefei, transfuziile de sânge cu specificitatea antigenica a donorului sau transfuziile nespecifice, ca si testele de histocompatibilitate sunt importante numai daca se asociaza cu imunosupresia, cu scopul diminuarii reactivitatii imunitare. Terapia imunosupresoare este foarte complexa, pentru ca nici un agent chimic nu are actiune strict selectiva asupra tesutului limfoid. Imunosupresia se realizeaza prin:

– iradierea x

– terapia imunosupresoare

– metode imunologice.

Terapia imunosupresoare. Medicamentele imunosupresoare inhiba nespecific reactivitatea imunitara si se administreaza atât dupa grefa tisulara, cât si pacientilor cu maladii reumatice, caracterizate prin reactivitate imunitara excesiva.

Imunosupresia s-a realizat cu o varietate de agenti terapeutici: hormoni corticosteroizi, medicamente citotoxice. Cele mai multe metode conventionale de imunosupresie îsi realizeaza efectul în mod neselectiv.

Medicamentele citotoxice au fost initial folosite în tratamentul neoplaziilor, dar reprezinta o modalitate importanta de imunosupresie pentru tratamentul maladiilor autoimune.

Chimioterapia administrata pacientilor neoplazici produce, uneori, o imunosupresie profunda. Medicamentele citotoxice sunt imunosupresoare deoarece distrug celulele imunocompetente sau blocheaza proliferarea lor.

Agentii citotoxici folositi pentru imunosupresie(dar si în tratamentul neoplaziilor) sunt:

– agenti alchilanti

– antimetaboliti: analogi ai purinelor (6-mercaptopurina si azatioprina); analogi pirimidinici (citozin-arabinozida);

– antagonistii acidului folic (methotrexatul).

Ciclofosfamida este compusul prototip al agentilor alchilanti. Actiunea sa este nespecifica, asupra tuturor subpopulatiilor de limfocite si a celulelor nelimfoide care intra în faza S.

Agentii din categoriile mentionate, au *actiune nespecifica,* adica actiunea lor nu este limitata la celulele imunocompetente. Ei produc leziuni asupra tuturor celulelor aflate în mitoza, inclusiv asupra celulelor

hematopoetice. Respingerea grefei poate fi blocata, dar actiunea neselectiva a acestor agenti produce efecte secundare toxice prea severe si rezultatele au fost considerate ca nesatisfacatoare.

Ciclosporina este un peptid ciclic lipofil, izolat din culturi de microorganisme si actioneaza specific asupra limfocitelor, inhibând transcrierea genica pe o cale dependenta de Ca, adica blocheaza progresia ciclului celular de la G_0 la G_1. Este un agent imunosupresor mai selectiv, deoarece actioneaza asupra celulelor Th, fara efecte notabile asupra altor subpopulatii de limfocite T, asupra limfocitelor B, granulocitelor sau macrofagelor. Efectul major pare a fi inhibitia sintezei IL-2. Imunosupresia cu ciclosporina este o modalitate imunofarmacologica, datorita actiunii sale selective fata de celulele imunocompetente.

În ultimii ani s-au identificat câtiva compusi chimici naturali, izolati ca si ciclosporina, din culturi de microorganisme: tacrolimus, sirolimus (rapamycin), mizoribine si spergualin.

Tacrolimus este o lactona macrociclica lipofila, cu mecanism de actiune asemanator cu al ciclosporinei. *Sirolimus* este un macrolid care inhiba proliferarea celulelor T, prin blocarea trecerii de la faza G_1 la faza S.

Imunosupresorul ideal va media inducerea tolerantei, în special în transplant, adica va permite sistemului imunitar sa adopte ca self, moleculele CMH specifice tesutului grefat.

Radiatia ionizanta x si gama produce ionizarea atomilor si genereaza radicali liberi, în special radicalul $OH\cdot$, foarte reactiv, principalul agent ce mediaza moartea celulelor iradiate. Efectele radiatiilor ionizante sunt dependente de doza. Celulele stem si celulele imature sunt foarte sensibile. Limfocitele T sunt mai rezistente decât limfocitele B, iar monocitele si macrofagele sunt relativ rezistente.

Corticosteroizii sunt cele mai folosite medicamente, cu efect inhibitor asupra raspunsului imun, dar si al proceselor inflamatorii. S-a propus mecanismul limfolizei, dar la om acest efect nu se produce. Timp de 4-6 ore dupa administrare, corticosteroizii reduc numarul de leucocite circulante (limfocite, monocite, eozinofile), dar creste semnificativ numarul neutrofilelor. Valorile leucocitelor revin la normal în 24 de ore. Limfocitele T, precum si monocitele parasesc circulatia si migreaza în maduva osoasa, iar limfocitele B sunt relativ rezistente la corticosteroizi. Eozinopenia, dupa injectarea corticosteroizilor, explica efectele benefice ale acestor hormoni la persoanele alergice.

Serul antilimfocitar (SAL) si *globulina antitimocitara* se obtin prin injectarea limfocitelor, respectiv a timocitelor, la o specie xenogena. Se folosesc celulele ductului toracic sau timocitele pentru imunizarea

iepurelui sau calului. Din serul heterolog se separa fractia imunoglobulinica, ce se administreaza intravenos pentru depasirea unei stari critice dupa grefare.

Anticorpii policlonali din SAL au fost înlocuiti cu AMC specifici fata de antigene celulare de suprafata: AMC anti-receptor de IL-2 si anti CD_4.

Deoarece citochinele sunt molecule foarte importante în reactia imunitara, s-a încercat neutralizarea lor cu receptori solubili.

Deletia specifica a populatiilor de limfocite este posibila cu preparatele denumite *imunotoxine*. Acestea sunt complexe ce constau din doua componente: un anticorp monoclonal care asigura recunoasterea specifica a tintei celulare si o componenta toxica (ricina, toxina difterica).

Capitolul 12

INTERACTIUNILE SISTEMULUI IMUNITAR CU SISTEMUL NEUROENDOCRIN

Sistemele imunitar, nervos si endocrin sunt interconectate structural (anatomic) si functional, ceea ce a condus la conturarea unor noi domenii interdisciplinare, ca *neuroimunoendocrinologia, neuroimuno-modularea* si *psihoneuroimunologia*. Sistemele enumerate au în comun capacitatea de raspuns la un numar de stimuli comuni (hormoni steroizi, citochine, neuropeptide), care furnizeaza baza moleculara a integrarii bidirectionale. Starea psihica influenteaza reactivitatea imunitara si intensitatea raspunsului inflamator a organismului. Exista dovezi certe ca anomaliile neuroendocrine au rol important în inducerea disfunctiilor imunitare, materializate, în primul rând, în manifestarile autoimune. Pe de alta parte, vârsta, genul si alti factori genetici regleaza interactiunile imuno-neuroendocrine.

Cele mai pregnante interactiuni neuroendocrinoimunitare se produc în starea de *stress*. Stressul este definit ca o conditie dinamica în cursul careia homeostazia normala (starea de echilibru a mediului intern) este perturbata sau periclitata. Starea de dezechilibru este indusa de factori de stress, fizici sau psihologici. Factorii de stress, fizici sau mentali, declanseaza un raspuns complex adaptativ, denumit *raspunsul de stress sau de alarma*, menit sa contracareze efectele factorului de stress. Intensitatea raspunsului adaptativ este dependenta de vârsta, gen, starea hormonala si de alti factori genetici.

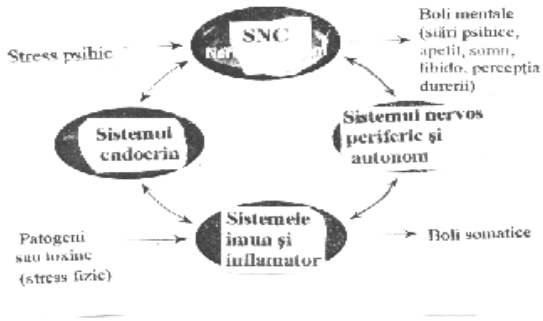


Fig. 135. Interactiuni *neuro-endocrino-imunitare*.

Stressul presupune în primul rând, modificarea unor componente mentale si comportamentale. Creste brusc activitatea sistemului nervos central ce controleaza starea de veghe, alerta, starea psihica, atentia, concentrarea atentiei si este inhibata activitatea vegetativa care controleaza hranirea si reproducerea. In raspunsul la stress se produc modificari fizice ale sistemului circulator, care redirectioneaza nutrientii spre organele activate. O reactivitate prea mare sau prea mica la stress poate produce sau poate contribui indirect la manifestari patologice.

Raspunsul la factorii de stress este mediat de factorul (hormonul) de eliberare a corticotropinei (CRH), de *axa hipotalamo-hipofizo-corticosu-prarenala si de sistemul nervos simpatic*. CRH este produs în primul rând în hipotalamus, dar si în alte arii ale creierului si în sistemul nervos periferic si are urmatoarele functii:

– controleaza starea de veghe, starea psihica si integreaza sistemele de raspuns la stress;

– activeaza axa hipofizo-corticosuprarenala, stimulând secretia ACTH si a corticosteroizilor;

– activeaza sistemul nervos simpatic, cu stimularea epinefrinei si norepinefrinei.

CRH este activatorul starii de alarma, manifestata prin cresterea glicemiei, a ritmului cardiac, a tensiunii arteriale, dar inhiba functia imunitara si raspunsul inflamator. Efectul activator al CRH asupra sistemului nervos simpatic este mediat de *locus ceruleus*, care îsi proiecteaza axonii în trunchiul cerebral si în hipotalamus, ceea ce contribuie direct la eliberarea mediatorilor simpatici (epinefrina si norepinefrina) în arii foarte largi ale SNC. Activarea sistemului nervos simpatic stimuleaza eliberarea CRH din neuronii nucleilor paraventriculari sub actiunea impulsurilor cu originea în locus ceruleus.

Sistemul de raspuns la stress functioneaza ca o bucla feedback pozitiva, bidirectionala. Activarea unui component al sistemului, activeaza pe celalalt. Serotonina si acetilcolina activeaza raspunsul la factorii de stress, iar MSH (hormonul stimulator al melanocitelor) si acidul gama aminobutiric sunt inhibitori.

Corticosteroizii sunt componentele majore ale sistemului de raspuns la stress si inhiba cele doua componente majore ale raspunsului (secretia CRH si sistemul nervos vegetativ), dar si reactivitatea imunitara si raspunsul inflamator.

Raspunsul activator la stress influenteaza axa hipotalamo-hipofizara cu componentele ei: hipotalamus-hipofiza-tiroida (HHT) si respectiv, hipotalamo-hipofizo-gonadala (HHG).

Chiar daca stressul acut stimuleaza secretia hipofizara a hormonului de crestere, stressul cronic, prin intermediul CRH, stimuleaza secretia hipofizara a somatostatinei (inhibitor al cresterii). Somatostatina, a carei secretie este stimulata de CRH, inhiba secretia de TSH, iar glucocorticoizii inhiba conversia tiroxinei, relativ inactiva, la triiodotiroxina. Aceste raspunsuri sunt adaptative si se coreleaza cu necesitatea limitarii pierderii energiei.

Activarea raspunsului la stress inhiba axa HHG, la mai multe nivele. CRH inhiba sinteza factorului eliberator al hormonului luteinizant din nucleul arcuat hipotalamic, fie direct, fie prin intermediul corticosteroizilor. Corticosteroizii inhiba secretia hormonului luteinizant (LH) hipofizar si concomitent, productia hormonilor gonadali: estrogeni, progesterona, testosteronul.

Hormonii tiroidieni si sexosteroizi influenteaza activitatea axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenale (HHC). Hipotiroidismul inhiba axa HHC. La organismele de sex feminin (soarece, sobolan, om), axa HHC este mai activa decât la masculi, adica stressul induce un raspuns mai amplu, masurabil prin nivelul mai înalt al corticosteroizilor. Ovarectomia diminua eliberarea corticosteroizilor, iar orhiectomia mareste rata sintezei corticosteroizilor la stress.

Raspunsul integrat neuro-imuno-endocrin este mediat nu numai de hormoni, ci si de interleuchine, cele mai cunoscute fiind IL-1 si IL-6.

IL-1 activeaza axa hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenala, stimulând eliberarea ACTH hipofizar, iar sinteza ei este inhibata de glucocorticoizi. Endotoxinele stimuleaza producerea IL-1 în hipofiza si astfel secretia ACTH este reglata local, în hipofiza.

IL-1 este sintetizata local, în arii discrete ale SNC (hipotalamus, hipocamp). Aceste arii regleaza raspunsul la stress.

Rolul corticosteroizilor în reglarea functiei imunitare

Asemanarea dintre hormoni si imunoglobuline rezulta din similitudinea structurala si functionala a celor doua categorii de molecule: ambele contin o regiune de legare la un receptor celular si o secventa cu rolul de a transmite semnale specifice la un sistem efector.

Exista dovezi ca moleculele CMH I, implicate în prezentarea antigenelor, au rol de receptor pentru insulina.

Corticosteroizii regleaza toate componentele raspunsului imunitar si inflamator, chiar si cresterea si diferentierea timocitelor. Nivelul corticosteroizilor creste într-un interval de ordinul minutelor, dupa expunerea la factorul de stress. Rolul lor este de a limita extensia raspunsului si a procesului inflamator. Amplitudinea lor prea mare poate sa produca leziuni, inclusiv maladii autoimune.

Administrarea corticosteroizilor, la rozatoare, produce moartea apoptotica a limfocitelor timice. Limfocitele T mature (periferice) umane sunt rezistente la corticosteroizi, dar cele timice sunt sensibile. Cresterea nivelului plasmatic al corticosteroizilor, produsa de stress, induce apoptoza timocitelor.

Corticosteroizii par a fi implicati în selectia timocitelor cu specificitate fata de antigenele nonself. Conceptia dominanta presupune ca timocitele sunt selectate pentru apoptoza sau supravietuire, în functie de capacitatea lor de a se asocia cu moleculele CMH. Timocitele cu receptori (RCT) de mare afinitate pentru moleculele CMH, sunt potential generatoare ale maladiilor autoimune si sufera moartea apoptotica. Cele cu receptori de mica afinitate pentru moleculele CMH mor de asemenea prin apoptoza, sub actiunea corticosteroizilor. Supravietuiesc numai timocitele cu receptori de aviditate medie pentru moleculele CMH. Selectia limfocitelor în timus este controlata de hormonii sintetizati local. Astfel, timusul exprima activitati neuroendocrine multiple, inclusiv sinteza CRH si ACTH. CRH stimuleaza secretia ACTH, iar ACTH induce producerea corticosteroizilor în celulele corticosuprarenalelor. Sinteza neuropeptidelor (CRH) în timus este deosebit de interesanta, având în vedere rezultatele care sustin ca celulele timice epiteliale contin enzime steroidogene si sintetizeaza corticosteroizi, în special în perioada fetala si neonatala. Astfel, timusul poate sa sintetizeze toti hormonii produsi prin activarea axei HHC.

Corticosteroizii regleaza dezvoltarea subpopulatiilor Th1 si Th2 de limfocite, inhibând sinteza citochinelor Th1 (IL-2, IFN γ).

Rolul sexosteroizilor

Hormonii steroizi sexuali influenteaza maturarea si diferentierea timocitelor. Timusul sufera modificari profunde în timpul sarcinii, dupa gonadectomie sau dupa administrarea exogena a hormonilor sexuali. Dupa gonadectomie, masa timusului creste, iar administrarea hormonilor sexuali (estrogen, testosteron) are efecte inverse.

Factorul hipotalamic de eliberare a hormonului luteinizant (RFLH), regleaza atât functia de reproducere, cât si functia imunitara. Acest hormon se sintetizeaza nu numai în creier, ci si în gonade, în glandele mamare, în placenta, splina si timus, având rol integrator al functiei neuro-endocrine reproducatoare si al functiei imunitare. In timus, limfocitele T sintetizeaza RFLH si au receptori specifici pentru acest hormon.

Îmbatrânirea sistemului imunitar, la om, începe dupa 30 de ani si se caracterizeaza prin cresterea productiei de autoanticorpi si diminuarea capacitatii de a produce anticorpi fata de antigenele nonself. Diminua sinteza IL-2, dar creste rata sintezei IL-4, IL-5 si IL-6. Aceste schimbari sugereaza o crestere numerica a subpopulatiei de limfocite Th2, în raport cu subpopulatia Th1. Diminua functia citotoxica. Creste nivelul plasmatic al IL-6, cu rol reglator al sintezei anticorpilor, dar si cu rol în progresia maladiilor autoimune sau a altor procese patologice, ca osteoporoza.

Un rol important în procesul de îmbatrânire se atribuie dehidroepiandrosteronului (DHEA), secretat de corticosuprarenale, sub controlul ACTH. Este un intermediar al biosintezei altor hormoni (testosteronul si estradiolul). DHEA circula în forma inactiva, de sulfat. Hormonul se activeaza numai în tesuturile care au DHEA-sulfataza, cu distributie diferentiala în organele limfoide. Nivelul plasmatic al sulfatazei scade odata cu îmbatrânirea sistemului imunitar si scade brusc în diferite boli cronice, inclusiv maladiile autoimune. Administrarea DHEA la rozatoare si om, restabileste functia imunitara la organismele vârstnice si are efect antagonic corticosteroizilor, care produc atrofia timica.

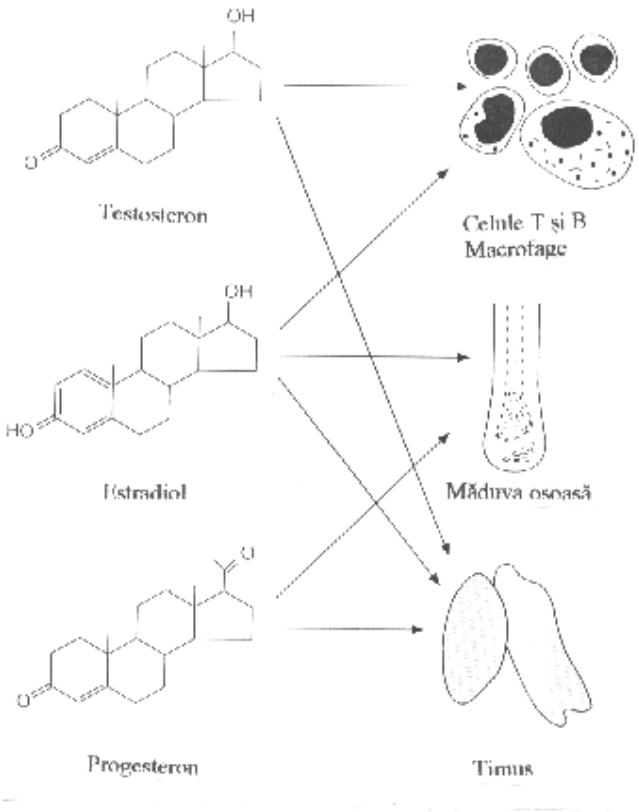


Fig. 136. Organele si celulele influentate de *hor-monii steroizi sexuali*. Acesti hormoni pot actiona în timpul dezvoltarii celu-lelor imunitare, dar si direct asupra celulelor ma-ture efectoare.

Hormonul de crestere, prolactina si hormonul tiroidian stimuleaza maturarea si diferentierea timocitelor. Hipofizectomia sau hiposecretia acestor hormoni hipofizari duce la imunodeficienta si hipoplazia timusului. Hormonul de crestere stimuleaza intens proliferarea celulelor precursoare ale timocitelor în maduva osoasa. Prolactina stimuleaza diferentierea celulelor T cu specificitate de antigen în organele limfoide periferice. Hormonul tiroidian stimuleaza cresterea timusului si a splinei. }oarecii hipotiroidieni au timus si splina hipoplazica, numar redus de celule TCD_8.

Interactiunile neuro-imuno-endocrine sunt bidirectionale. Tesuturile si celulele sistemului imunitar sintetizeaza un spectru larg de hormoni neuro-endocrini. Foarte importanta este sinteza CRH, un

reglator esential al raspunsului la stress, în timus, splina, hipofiza anterioara, corticosuprarenale, ovar, testicul, intestin, inima, plamân. In timus si splina, CRH este sintetizat de celulele T, unde exercita efecte reglatoare autocrine sau paracrine. CRH este de asemenea sintetizat local în focarele inflamatorii acute sau cronice, inclusiv în lichidul sinovial al pacientilor cu artrita reumatoida.

Factori neuroendocrini favorizanti ai maladiilor autoimune umane

Diferentele functionale cu privire la intensitatea raspunsului axelor hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliene (HHC) si hipotalamo-hipofizo-gonadale (HHG) sunt importante pentru întelegerea manifestarilor autoimune. Maladiile autoimune sunt mult mai frecvente la femei decât la barbati. De exemplu, raportul pe sexe al tiroiditei autoimune este de 19/1, al lupusului de 9/1, iar al artritei reumatoide, de 3-4/1. Mai mult, maladiile autoimune tind sa se dezvolte, sa aiba intensitate maxima ori sa diminue, în perioadele de schimbare a activitatii axei HHG (pubertate, menstruatie, sarcina, perioada postpartum, menopauza sau în timpul unui stress psihologic de amploare). Toate aceste perioade sunt asociate cu modificari ale secretiei factorului hipotalamic de eliberare a LH, a LH hipofizar, a hormonilor sexuali si a altor hormoni. Frecventa fenomenelor autoimune creste cu vârsta, corelata cu schimbarile neuroendocrine.

Artrita reumatoida este asociata cu o insuficienta a sintezei corticosteroizilor. Nivelul corticosteroizilor plasmatici tinde sa se coreleze cu severitatea inflamatiei, dar pacientii cu afectiune de intensitate medie au nivele inferioare ale corticosteroizilor comparativ cu indivizii normali. Nivelul testosteronului la pacientii cu artrita reumatoida, în special la barbati, tinde sa aiba valori scazute, iar nivelul estrogenului este nemodificat. Terapia cu testosteron amelioreaza maladia. Estrogenii nu par sa produca o exacerbare a artritei reumatoide, iar contraceptivele orale încetinesc evolutia maladiei. Odata cu scaderea brusca a nivelului estrogenilor (perioada postpartum, intervalul care precede menstruatia, menopauza), artrita reumatoida se intensifica. In acelasi timp diminua secretia de corticosteroizi, deoarece estrogenii influenteaza axa HHC. Nivelul prolactinei la pacientii cu artrita reumatoida este variabil(crescut, normal sau scazut). Artrita reumatoida se remite frecvent în timpul sarcinii si se reactiveaza sau se declanseaza în perioada postpartum, îndeosebi la femeile care alapteaza. Alaptarea este însotita cu cresterea marcata a secretiei de prolactina si cu supresia functiei axei HHC.

Lupusul sistemic eritematos are o dominanta neta la femei, ceea

ce denota rolul hormonilor sexuali în declansarea si evolutia acestei maladii. În plasma pacientilor s-a relevat un dezechilibru între nivelul androgenilor si estrogenilor. Dezechilibrul poate fi primar sau secundar, datorat unei enzime care converteste androgenii la estrogeni. Barbatii cu lupus sunt prevalent hipoandrogenici. Nivelul scazut al androgenilor favorizeaza imunitatea mediata humoral, iar estrogenii favorizeaza autoimunitatea, prin stimularea producerii de prolactina, care are efect activator asupra functiei imunitare. Pacientii cu lupus se caracterizeaza prin hiperprolactinemie. In timpul sarcinii, maladia se intensifica.

Tiroidita autoimuna se declanseaza frecvent în perioada postpartum, caracterizata prin hipocortisolemie.

Perioada sarcinii se caracterizeaza prin supresia imunitatii mediate celular si mentinerea sau chiar cresterea imunitatii humorale. Setul de citochine sintetizate de celulele Th1 diminua (IL-2 si IFN γ), ceea ce elimina riscul avortului imunitar. Diminuarea sintezei IFN γ este esentiala pentru pastrarea sarcinii, deoarece cantitatile mari favorizeaza avortul. Nivelul plasmatic al corticosteroizilor, estrogenilor si progesteronei creste. Starea hormonala complexa în timpul sarcinii pare sa conditioneze remisia maladiilor autoimune dependente de imunitatea celulara, ca de exemplu artrita reumatoida si agravarea maladiilor dependente de procese ale imunitatii humorale, ca de exemplu, glomerulonefrita în lupusul eritematos.

Postpartum, starea hormonala se modifica brusc. Corticosteroizii, estrogenii si progesterona scad la nivele subnormale, iar imunitatea mediata celular se restabileste, ceea ce permite declansarea sau activarea unor maladii autoimune, asa cum este artrita reumatoida, datorita cresterii secretiei de prolactina.

Perioadele de sarcina si postpartum se caracterizeaza prin modificari ample ale starii hormonale si sunt asociate frecvent cu declansarea sau activarea unor maladii autoimune, ceea ce ilustreaza rolul mecanismelor endocrine în reglarea functiei imunitare.

Bibliografie

Continutul acestei carti a fost redactat pe baza consultarii unui numar mare de articole aparute în diferite *periodice* si a unor *capitole speciale* sau *volume* de *Imunologie*, publicate în tratate de *Microbiologie* sau de *Virologie*. Sintezele aparute în *Annual Review of Immunology* au constituit o sursa informationala de o valoare deosebita.

Periodice

Annual Reviews Biochemistry
Annual Reviews Immunology
Annual Reviews Microbiology
Bulletin d'Institut Pasteur
Cancer Immunology
Cell
Clinical Microbiology Reviews
EMBO Journal
Immunology Today
Journal of Immunology
Mediators of inflamation
Microbiology and Molecular Biology Reviews
Nature
Scientific American
Science

Carti

DELVES P.J, ROITT I. M. – *Encyclopedia of Immunology*, vol. 1-4, sec. ed., 1998, Acad. Press.

FIELDS B. N., KNIPE D. M., HOWLEY P. M. – *Fields Virology*, 3rd edition, Lippincot Raven Publishers, Philadelphia, 1996

MALE D., CHAMPION B., ANNE COOK – *Advanced Immunology*, J.B. Lippincot Company, 1987.

PATRICK S. ADN LARKIN M. J. - *Immunological and molecular aspects of bacterial virulence*, J. Wiley & Sons, 1995.

ROITT I. M. – *Essential Immunology*, ninth edition, 1997, Blackwell Science

SAMTER M, TALMAGE D. W., FRANK M. M., AUSTEN K. F., CLAMAN H. N. – *Immunological diseases*, vol. I, II, fourth ed., Boston, Toronto.

SERHAN C. N., WARD P. A. - *Molecular and Celular basis of Inflamation*, 1999, Humana Press.

SHEEHAN CATHERINE – *Clinical Immunology*, *Principles and Laboratory Diagnosis*, sec. edition, 1997, Lippincot, Philadelphia, New York

Topley and Wilson's *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier, 1990

Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, vol. IV *Immunology*, Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman, 1998.

WEIR D. M., STEWART J. – *Immunology* , seventh edition, Longman Group, UK, 1993.
ZARNEA G. – Tratat de Microbiologie, vol. IV *Imunobiologie*, Ed. Academiei Române, 1990.
ZARNEA G., Mihaescu Gr. – *Imunologie*, Ed. Universitatii Bucuresti, 1995.
ZWILLING B. S., EISENSTEIN T. K. – *Macrophage- Pathogen Interactions*, 1994, New York, Basel, Hong Kong.